

Université de Montréal

**Synthèses et caractérisations de copolymères  
organométalliques biodégradables et biocompatibles à  
base de salicylidènes pour des applications  
pharmaceutiques**

par

Véronique Nadeau

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de docteur  
en sciences pharmaceutiques  
option technologie pharmaceutique

Juillet 2006

© Véronique Nadeau, 2006



QV  
705  
U58  
2006  
V. 013



## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Synthèses et caractérisations de copolymères organométalliques biodégradables et  
biocompatibles à base de salicylidène pour des applications pharmaceutiques

présentée par :

Véronique Nadeau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Françoise Winnik, président-rapporteur

Dr. Patrice Hildgen, directeur de recherche

Dr. Sophie-Dorothée Clas, co-directrice

Dr. Robert Prud'homme, membre du jury

Dr. Françoise Zammattio, examinateur externe

À déterminer, représentant du doyen de la FES

## Résumé

La présente recherche porte sur la synthèse et la caractérisation de polymères organométalliques, biodégradables et biocompatibles. Ces polymères sont à base de salen auxquels ont été complexés différents métaux : le manganèse, le zinc, le cuivre, le cobalt, le nickel, le calcium et le fer. On y présente la synthèse de polyesters de salen *co*-alcanes et *co*-téréphtaliques ainsi que des structures réticulées à base de PLA qui pourraient servir en régénération tissulaire. Leur cytotoxicité ainsi que leur caractère conducteur sont étudiés.

De plus, une structure polymérique capable de recevoir facilement des molécules variées est développée. Ces différentes structures sont constituées de PLA, PCL, PGLY et PLA-PGLY branchées. Par la suite, avec des modifications mineures de la structure du PLA greffé et l'ajout de salens métalliques, de nouveaux polymères susceptibles de se complexer à l'ADN sont développés afin de servir de vecteurs pour la livraison de matériel génétique. Leur cytotoxicité, leur caractère dégradable ainsi que leur complexation avec l'ADN sont aussi étudiés.

La caractérisation physicochimique complète de tous ces polymères est effectuée à l'aide de : la RMN- $^1\text{H}$ , la RMN- $^{13}\text{C}$ , l'IR, l'analyse élémentaire, la spectrométrie de masse, la DSC, la TGA, le point de fusion, le microscope polarisant, l'AFM, l'angle de contact et l'absorption atomique.

**Mots-clés** : Polyester de Salen, Régénération Tissulaire, Thérapie Génique, AFM.

## Abstract

The present research describes the synthesis and characterization of organometallic, biodegradable and biocompatible polymers. These polymers of salen to which various metals like manganese, zinc, copper, cobalt, nickel, calcium and iron were complexed. The synthesis of polyesters of salen *co*-alkanes and *co*-terephthalic is described. These polymers were tested for their cytotoxicity as well as their conductivity.

The development of a polymeric structure able to receive various molecules is carried out. The backbones of these polymers are PLA, PCL, PGLY and PLA-PGLY. Moreover, subsequent minor modifications of the PLA structure and addition of metal salens led to new polymers with the ability to complex the DNA molecules and to be used as vectors for the gene delivery of material. These polymers were also studied for their cytotoxicity, their biodegradable character as well as their complexation with DNA.

The complete physico-chemical characterization of the synthesized polymers was carried out using: NMR, IR, elemental analysis, mass spectrometry, DSC, TGA, melting point, polarizing microscope, AFM, contact angle and atomic absorption.

**Keywords:** Polyester of Salen, Tissue Regeneration, Gene Therapy, AFM

## Table des matières

<b>Résumé.....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>iv</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>xii</b>

## Chapitre 1. Synthèse de biomatériaux à base de salen..... 1

1.1 Les salens.....	2
1.1.1 La synthèse des salens .....	2
1.1.2 La complexation des salens.....	4
1.1.3 Les métallosalens utilisés en catalyse chimique .....	6
1.1.3.1 L'effet des substituants et de la conformation de la base de Schiff .....	6
1.1.3.2 Complexes de titane et de vanadium .....	8
1.1.3.3 Complexes de manganèse (Mn) et de chrome .....	10
1.1.3.4 Complexes de fer .....	12
1.1.3.5 Complexes de cobalt pour l'ouverture d'époxyde.....	12
1.1.3.6 Complexes de nickel et de cuivre .....	13
1.1.3.7 Complexes de zinc .....	14
1.1.3.8 Les métallosalens soutenus par une chaîne polymérique .....	16
1.1.4 Les métallosalens utilisés en catalyse biologique .....	18
1.1.4.1 Les mimétiques de la superoxyde dismutase .....	19
1.1.4.2 Les propriétés antioxydantes des macrocycliques.....	20
1.1.4.3 Les propriétés antioxydantes des métalloporphyrines .....	21
1.1.4.4 Les propriétés antioxydantes des salens .....	21
1.1.5 Les métallosalens utilisés pour leur propriété conductrice .....	22
1.1.5.1 Mécanisme de la conduction; la théorie des bandes.....	24
1.1.5.2 Les bases de Schiff et les métallosalens aux propriétés conductrices .....	26

1.1.5.3	Fabrication de films polymériques conducteurs.....	27
1.1.5.3.1	Poly-base de Schiff.....	27
1.1.5.3.2	Polymétallosalen.....	28
1.1.5.3.3	Polysalen-thiophène.....	29
1.1.5.4	Fabrication d'électrodes modifiées.....	30
1.1.5.4.1	Poly-base de Schiff.....	30
1.1.5.4.2	Polysalen-pyrrole.....	31
1.1.6	Les métallosalens : un outil pharmaceutique prometteur.....	32
1.2	Les biomatériaux.....	32
1.2.1	La biocompatibilité, biointégration et biorésorption des biomatériaux.....	33
1.2.2	La biodégradation des polyesters.....	33
1.2.2.1	Le PLA.....	35
1.2.2.2	L'hydratation.....	37
1.2.2.3	La dépolymérisation.....	37
1.2.2.4	La perte de masse.....	38
1.2.2.4.1	L'érosion.....	38
1.2.2.5	La solubilisation/absorption.....	40
1.2.2.6	L'élimination.....	40
1.3	Présentation du projet de recherche.....	40
1.3.1	L'originalité du projet de recherche.....	40
1.3.2	Les biomatériaux à base de salen au service de la régénération tissulaire ...	41
1.3.2.1	La thérapie cellulaire.....	42
1.3.2.2	Le génie tissulaire.....	42
1.3.2.3	Les structures de guidage.....	43
1.3.2.4	La régénération nerveuse.....	43
1.3.2.5	La problématique.....	45
1.3.2.6	Les objectifs généraux:.....	46
1.3.2.7	Les hypothèses et objectifs spécifiques.....	47



1.3.3	Les biomatériaux à base de salen au service de la thérapie génique .....	48
1.3.3.1	Les vecteurs : .....	50
1.3.3.1.1	Les vecteurs viraux .....	51
1.3.3.1.2	Les vecteurs non-viraux .....	52
1.3.3.2	La problématique .....	54
1.3.3.3	Les objectifs généraux .....	54
1.3.3.4	Hypothèses et objectifs spécifiques .....	55

## **Chapitre 2. Copolymères linéaires en régénération tissulaire .....56**

2.1	Article 1: Synthesis and characterization of biodegradable and charged salen-based polymers .....	57
2.1.1	Introduction .....	58
2.1.2	Experimental Section .....	59
2.1.3	Results and Discussion .....	69
2.1.4	Conclusion .....	81
2.1.5	Acknowledgments .....	81
2.1.6	References .....	81
2.2	But .....	83
2.3	Résultats obtenus et complément d'information .....	83
2.3.1	Preuves de synthèses .....	83
2.3.1.1	Synthèse des bases de Schiff .....	83
2.3.1.2	Synthèse des complexes .....	88
2.3.1.3	Synthèse des polyesters .....	91
2.3.2	Théorie du champ cristallin .....	93
2.3.3	Études thermiques, cristallinité et hydrophobicité des polyesters .....	97
2.3.4	Étude de la conductivité .....	98
2.3.5	Cytotoxicités .....	98
2.4	Résultats complémentaires .....	99

2.4.1	Polymères réticulés.....	99
2.4.2	Absorption atomique .....	106
2.4.3	Cytotoxicité .....	109
2.5	Conclusion .....	109

### **Chapitre 3. Copolymères greffés en thérapie génique : Conception d'une structure polymérique greffée ..... 111**

3.1	Article 2: Synthesis of new versatile functionalized polyesters for biomedical applications.....	112
3.1.1	Abstract.....	112
3.1.2	Introduction : .....	113
3.1.3	Experimental Section.....	114
3.1.4	Results and Discussion .....	122
3.1.4.1	General synthesis approach of grafted polylactide.....	122
3.1.4.2	General synthetic approach of grafted polycaprolactone.....	127
3.1.4.3	General synthesis approach for grafted PGLY .....	129
3.1.5	Conclusion .....	132
3.1.6	Acknowledgment.....	132
3.1.7	References .....	132
3.2	But.....	134
3.3	Résultats obtenus et complément d'information.....	134
3.3.1	La synthèse.....	134
3.3.2	L'analyse thermique .....	139
3.3.3	L'analyse de la masse molaire .....	140
3.3.4	Cytotoxicité.....	141
3.4	Résultats supplémentaires.....	141
3.4.1	Synthèse du PLA-PGLY greffé.....	141
3.4.2	Cytotoxicité.....	144

5	Conclusion .....	145
---	------------------	-----

## **Chapitre 4. Utilisation des polymétallosalens greffés en thérapie génique.....146**

4.1	Article 3: AFM study of a New Carrier Based on PLA and Salen Copolymers for Gene Therapy. ....	147
4.1.1	Abstract .....	147
4.1.2	Introduction .....	147
4.1.3	Results and Discussion .....	148
4.1.3.1	General description.....	148
4.1.3.2	Schiff bases and complex synthesis.....	149
4.1.3.3	Carrier synthesis based on PLA and salen. ....	149
4.1.3.4	AFM study on SB-PLA and CS-PLA non-oriented film.....	151
4.1.3.5	AFM study CS-PLA non-oriented versus oriented film. ....	151
4.1.3.6	AFM study on CS-PLA and SB-PLA oriented film.....	151
4.1.3.7	AFM study on complexed DNA-CS-PLA.....	152
4.1.4	Conclusions.....	154
4.1.5	Experimental .....	154
4.1.5.1	General .....	154
4.1.5.2	Synthesis .....	154
4.1.6	References.....	158
4.2	But .....	159
4.3	Résultats obtenus et complément d'information.....	159
4.3.1	La synthèse.....	159
4.3.2	L'analyse AFM .....	160
4.4	Résultats complémentaires .....	162
4.4.1	Absorption atomique .....	162
4.4.2	Étude de complexation par électrophorèse sur gel d'agarose.....	164

4.4.3	Étude de dégradation .....	165
4.4.4	Cytotoxicité .....	168
4.5	Conclusion .....	169
<b>Chapitre 5. Discussion générale.....</b>		<b>170</b>
5.1	Polymères conducteurs en régénération tissulaire .....	171
5.2	Conception de polymères greffés.....	180
5.3	Utilisation des polymétallosalens greffés en thérapie génique.....	186
<b>Conclusion.....</b>		<b>189</b>
<b>Bibliographie .....</b>		<b>I</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1. Analyse élémentaire des métallosalens .....</b>	<b>90</b>
<b>Tableau 2. Distribution des masses molaires des PLA-SM réticulés .....</b>	<b>102</b>
<b>Tableau 3. Conductivité des PLA-SM réticulés.....</b>	<b>106</b>
<b>Tableau 4. Dosage par absorption atomique des métaux présents sur les polymères</b>	<b>108</b>
<b>Tableau 5. Dosage des métaux présents sur les polymères de type PLA-métallosalen</b> <b>.....</b>	<b>163</b>
<b>Tableau 6. La conductivité des différents polymères .....</b>	<b>177</b>
<b>Tableau 7. Complexes Al(salen) employés comme catalyseurs chimiques lors de</b> <b>réactions d'ouverture de cycle .....</b>	<b>183</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1. Approche générale de synthèse des salens.....</b>	<b>3</b>
<b>Figure 2. Approche générale de synthèse des métalloalens .....</b>	<b>4</b>
<b>Figure 3. Trajectoire d'approche privilégiée par le substrat<sup>2</sup> .....</b>	<b>7</b>
<b>Figure 4. Différentes conformations du complexe de salen .....</b>	<b>8</b>
<b>Figure 5. Structure de l'indénol et d'une base de Schiff complexée au titane.....</b>	<b>8</b>
<b>Figure 6. Le catalyseur Ti(salen) utilisé en addition énantiosélective via l'activation électrophile et nucléophile. ....</b>	<b>9</b>
<b>Figure 7. Le Cr(salen); catalyseur énantiosélectif pour la réaction Diels-Alder .....</b>	<b>10</b>
<b>Figure 8. Le complexe Mn(salen)Cl; catalyseur énantiosélectif d'époxydation .....</b>	<b>11</b>
<b>Figure 9. Le complexe Cr(salen); catalyseur redox énantiosélectif et diastéréosélectif.....</b>	<b>11</b>
<b>Figure 10. Le complexe Co(salen) .....</b>	<b>12</b>
<b>Figure 11. Arrangement de type « tête à queue » entre deux unités de salen.....</b>	<b>13</b>
<b>Figure 12. Complexe bimétallique dérivé du Ni(salen) utilisé comme catalyseur pour la réaction d'addition de Michael.....</b>	<b>14</b>
<b>Figure 13. Formation d'un catalyseur à activité bifonctionnel par la coordination d'un Zn(salen) avec le ZnEt<sub>2</sub> (diéthylzinc).....</b>	<b>15</b>
<b>Figure 14. L'alkylation énantiosélective de la cétone s'effectue en présence d'un catalyseur de type Zn(salen) .....</b>	<b>16</b>
<b>Figure 15. Métalloalens réticulé à une structure polymérique .....</b>	<b>17</b>
<b>Figure 16. Métalloalens greffé à une structure polymérique .....</b>	<b>18</b>
<b>Figure 17. Différentes classes d'antioxydants catalytiques .....</b>	<b>20</b>
<b>Figure 18. Les antioxydants effectuent la détoxification des espèces réactives du milieu .....</b>	<b>21</b>
<b>Figure 19. Conductivité électrique de différents polymères conducteurs<sup>61</sup> .....</b>	<b>23</b>
<b>Figure 20. Représentation du polypyrrole soumis au dopage de type p et n .....</b>	<b>24</b>

<b>Figure 21. Schéma explicatif de la théorie des bandes d'énergie pour des matériaux (a) conducteurs, (b) isolants, (c) semi-conducteurs, (d) semi-conducteurs de type n et (e) semi-conducteurs de type p<sup>62</sup></b>	26
<b>Figure 22. Poly-bases de Schiff conductrices</b>	28
<b>Figure 23. Différents polysalens conducteurs</b>	29
<b>Figure 24. Polysalens-thiophènes conducteurs</b>	30
<b>Figure 25. Base de Schiff 3-[1-(2-aminophénylénamino)-éthyl]-6-méthylpyran-2,4-dione</b>	31
<b>Figure 26. Poly[(Ni-bpsalen)-pyrrole] conducteur</b>	32
<b>Figure 27. Formule du lactide</b>	36
<b>Figure 28. Le neurone (<a href="http://student-medical.ibelgique.com/alzheimerfr.html">http://student-medical.ibelgique.com/alzheimerfr.html</a>)</b>	45
<b>Figure 29. Représentation de polymères</b>	47
<b>Figure 30. La thérapie génique</b>	51
<b>Figure 31. Mécanisme de formation des bases de Schiff</b>	85
<b>Figure 32. Spectre RMN <sup>1</sup>H; (A) métallosalen 2b (DMSO-D<sub>6</sub>, présence d'acétone); (B) base de Schiff 1a (DMSO-D<sub>6</sub>, présence d'acétate d'éthyle); (C) trans-1,2-diaminocyclohexane (DMSO-D<sub>6</sub>) et (D) 2,5-dihydroxybenzaldehyde (CDCl<sub>3</sub>-TMS, présence d'acétate d'éthyle)</b>	87
<b>Figure 33. Mécanisme de formation des métallosalens</b>	89
<b>Figure 34. Mécanisme de formation des polymétallosalens linéaires</b>	92
<b>Figure 35. Les 5 orbitales d (<a href="http://pt.wikipedia.org/wiki/Orbital_at%C3%B4mico">http://pt.wikipedia.org/wiki/Orbital_at%C3%B4mico</a>)</b>	94
<b>Figure 36. Séparation des orbitales d sous l'influence d'un champ fort de ligands plan-carré ou tétraédrique</b>	95
<b>Figure 37. Détermination de la structure tridimensionnelle des métallosalens à base de cuivre, de manganèse et de zinc</b>	96
<b>Figure 38. Analyse thermogravimétrique du polymère linéaire 4c</b>	97
<b>Figure 39. Synthèse du (DL)-PLA</b>	100
<b>Figure 40. Synthèses des polymères réticulés</b>	101

<b>Figure 41. Analyse enthalpique différentielle du PLA-2I</b> .....	103
<b>Figure 42. Analyse thermogravimétrique du PLA-2I</b> .....	104
<b>Figure 43. Image AFM du PLA-2I réticulé.</b> .....	105
<b>Figure 44. L'appareil d'absorption atomique</b> .....	107
<b>Figure 45. Résultats de la MTT et LDH des polymères réticulés.</b> .....	109
<b>Figure 46. Synthèse par ouverture de cycle du PLA greffé.</b> .....	136
<b>Figure 47. Mécanisme de l'hydroboration-oxydation</b> .....	137
<b>Figure 48. Mécanisme de la réaction de Jones</b> .....	138
<b>Figure 49. Mécanisme d'action du chlorure de thionyle</b> .....	139
<b>Figure 50. Identification RMN</b> .....	142
<b>Figure 51. Analyse MTT <i>in vitro</i> du PLA<sub>86%</sub>-PGLY<sub>12%</sub>-acide<sub>2%</sub></b> .....	145
<b>Figure 52. Structure du cis-PLA<sup>172</sup></b> .....	160
<b>Figure 53. Électrophorèse sur gel de d'agarose</b> .....	165
<b>Figure 54. Étude de dégradation du (D)-PLA-acide<sub>1%</sub></b> .....	166
<b>Figure 55. Détermination de la cinétique de dégradation du (D)-PLA-acide<sub>1%</sub></b> .....	167
<b>Figure 56. Polydispersité du (D)-PLA-acide<sub>1%</sub></b> .....	168
<b>Figure 57. Résultats de la MTT des polymères greffés</b> .....	169
<b>Figure 58. Quelques catalyseurs chimiques à base de salen en développement</b> .....	184



## Liste des abréviations

AA = Absorbance atomique

ADN = Acide désoxyribonucléique

AFM = Microscope à force atomique

AlMe<sub>3</sub> = Triméthyl aluminium

BuLi = Butyl lithium

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = Dichlorométhane

Co = Cobalt

Cr = Chrome

Cu = Cuivre

DMF = Diméthyl-formamide

DSC = Analyse enthalpique différentielle (differential scanning calorimetry)

Et<sub>2</sub>O = Éther diéthylique

FDA = Food and Drug Administration

Fe = Fer

GaMe<sub>3</sub> = Triméthyl gallium

GPC = Chromatographie par perméation de gel

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Peroxyde d'hydrogène

ICP = Spectromètre à émission plasma

InMe<sub>3</sub> = Triméthyl indium

IR = Infrarouge

IRM = Imagerie de résonance magnétique

KH = Hydrure de potassium

LD = Limite de détection

LDH = Lactate déshydrogénase

MeLi = Méthyl lithium

Me<sub>3</sub>SiCN = Cyanotriméthylsilane

Mesityl = 2,4,6-triméthylbenzène

Me<sub>2</sub>Zn = Diméthylzinc

MgSO<sub>4</sub> = Sulfate de magnésium

Mn = Manganèse

MTT = 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NaClO = Hypochlorite de sodium

NaH = Hydrure de sodium

NaIO<sub>4</sub> = Sodium métaperiodate

NHMe<sub>2</sub> = Diméthylamine

Ni = Nickel

PCL = Polycaprolactone

PEG = Poly(éthylèneglycol)

PGA = Polyglycolide

PGLY = Polyglycine

PhIO = Périodate de phényl

PLA = Acide polylactide

PLGA = Acide poly(lactique-*co*-glycolique)

PLA-SM = Polylactide-*co*-salen métallique

POC = Polymérisation par ouverture de cycle

RMN-C = Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du carbone

RMN-H = Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton

RNase = Ribonucléase

Sc = Scandium

SM = Salen métallique

Snph<sub>4</sub> = Tétraphénylétain

SO = Superoxyde

SOD = Superoxyde dismutase

SODm = Mimétique de la superoxyde dismutase

Tg = Température de transition vitreuse

TGA = Analyse thermogravimétrique

THF = Tétrahydrofurane

Ti = Titane

TiCl<sub>4</sub> = Tétrachlorure de titane

V = Vanadium

Zr = Zirconium

ZrCl<sub>4</sub> = Tétrachlorure de zirconium

*À mes parents, Sylvie et Yves et à toi Bruno  
avec tout mon amour*

*«Être homme, c'est précisément être responsable. C'est connaître la honte en face d'une misère qui ne semblait pas dépendre de soi. C'est être fier d'une victoire que les camarades ont remportée. C'est sentir, en posant sa pierre, que l'on contribue à bâtir le monde.»*

**Antoine de Saint-Exupéry, Terre des Hommes**

## Remerciements

Cette thèse est un travail de longue haleine et elle n'aurait pas vu le jour sans les encouragements de nombreuses personnes. Je prends donc quelques lignes pour vous remercier, vous tous qui m'êtes précieux.

En tout premier lieu, j'aimerais remercier mon directeur de recherche Patrice Hildgen pour avoir vu en moi des capacités que je ne croyais pas posséder, pour m'avoir encouragée à me surpasser et pour m'avoir montré le chemin de la réussite. De plus, je remercie la Faculté de pharmacie pour les bourses d'excellence et de rédaction obtenues.

D'autre part, je vous remercie, chers parents, pour avoir cru en moi bien avant que j'y croie moi-même, pour m'avoir entourée d'amour, de compréhension et de support. Je voudrais aussi remercier Nicole Généreux et Bernard Chapleau qui ont eu une influence certaine sur mon cheminement professionnel en plus d'être mes correcteurs attitrés. Un titre qu'ils partagent avec Ginette Faubert, grande amie de la famille. Encore merci, pour toutes ces nuits blanches à corriger mes nombreux travaux. Un merci tout spécial à ma grand-mère Madeleine qui, par son exemple, a su promouvoir l'éducation des femmes et le transmettre à travers les générations. Son soutien et son amour me sont précieux. Je voudrais également remercier mon conjoint, Bruno Prévost, pour son écoute, sa compréhension et sa patience. Je tiens à vous remercier pour tous les sacrifices que vous avez faits afin que ce projet devienne notre réussite. Vous m'avez, chacun à votre tour, servi d'exemple à suivre, de guide et de motivation. Vous êtes ma famille, mes amours et toute ma vie. Ma gratitude va bien au-delà des mots qui sauraient la décrire.

Ce qui fait qu'une journée de travail n'en représente plus une, c'est le labeur de toute l'équipe qui me soutient. Je voudrais remercier mes collègues de travail et amis : Névine Rizkalla, Taha Hamady, Richard Quesnel, Shilpa Sant, Nicolas Bertrand, Salma Louati, Renu Singh, Aurélian Corbeau, Alexander Agudelo et Julie Murray. J'aimerais remercier tout particulièrement Jean-Michel Rabanel pour avoir effectué tous les tests de

cultures cellulaires sur mes produits ainsi que pour ses précieux conseils et multiples discussions stimulantes.

Je remercie Jean-Daniel Brion ainsi que toute l'équipe de travail du laboratoire de biomolécule de l'Université Paris-Sud XI pour leur accueil. Je remercie spécialement Mouade Alami pour son soutien. Merci au Ministère de l'éducation du Québec pour le financemant (bourse de mobilité du Québec) grâce auquel cet échange scientifique a été possible. Ce séjour de recherche restera à jamais gravé dans ma mémoire comme un moment enrichissant tant d'un point de vue scientifique que personnel.

En terminant, j'aimerais remercier ma co-directrice Sophie-Dorothée Clas et les membres du jury pour la lecture et la correction de cette thèse.

## **Chapitre 1. Synthèse de biomatériaux à base de salen**

*«L'homme se découvre quand il se mesure avec l'obstacle.»*

**Antoine de Saint-Exupéry, Terre des Hommes**



## 1.1 Les salens

En 1864, Hugo Schiff fut le premier à décrire la base qui portera son nom comme étant le produit de la condensation d'un aldéhyde et d'une amine.<sup>1</sup> Les bases de Schiff sont capables de chélater les métaux et de les stabiliser sous leurs formes oxydées. Ce qui leur a valu de nombreuses études, dont celle-ci.

Lorsque deux moles de salicylaldéhyde sont combinées à une mole de diamine, on obtient un chélate particulier nommé salen. À l'origine, le terme salen décrivait seulement les bases de Schiff tétradentates dérivées de l'éthylènediamine. Cette définition s'est élargie et inclue maintenant, d'une façon plus générale, la classe de base de Schiff tétradentate de type [O,N,N,O]. Ces dénommés salens sont semblables à des demi-porphyrines mais ils se préparent beaucoup plus facilement.

Le terme salen sera grandement employé puisqu'il est l'objet principal de cette thèse. Il me semble primordial de bien le définir et d'exposer son utilité d'un point de vue pharmaceutique tout comme d'un point de vue chimique puisque, souvent, l'un inspire l'autre.

### 1.1.1 La synthèse des salens

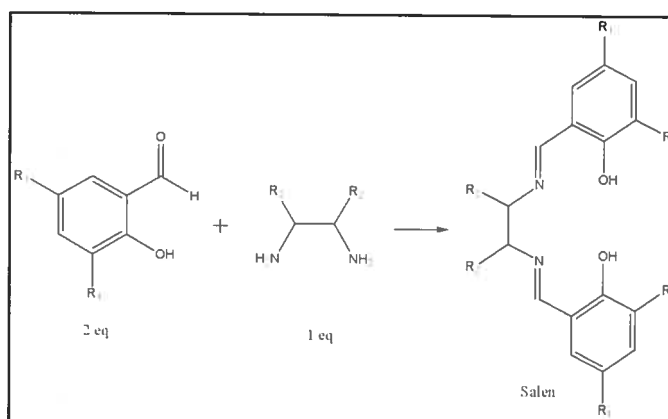
Il existe de nombreuses voies de synthèse relatives aux salens complexés. L'approche générale employée implique la formation d'une base de Schiff suivie de la coordination de celle-ci avec un métal.

La condensation de deux équivalents de salicylaldéhyde ou d'un de ses dérivés avec un équivalent de 1,2-diamine conduit à la formation d'un salen (**Figure 1, page 3**).<sup>2</sup> Différents salicylaldéhydes et différentes 1,2-diamines, porteurs de substituants, sont disponibles commercialement et peuvent servir de précurseurs à la réaction de

condensation. Une variété de synthèses est donc envisageable tout en faisant appel à des conditions réactionnelles simples.<sup>3</sup>

Cette synthèse peut être réalisée dans différentes conditions et en présence de différents solvants. Généralement, la présence d'un agent déshydratant, tel que le sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ ), est nécessaire pour favoriser sa formation.<sup>4</sup> Lorsque la réaction se produit en solution dans le toluène ou le benzène, l'eau produite par la réaction de condensation peut être éliminée à l'aide d'un appareil de Dean Stark. Un autre solvant valable pour la préparation d'une base de Schiff est l'éthanol à température ambiante ou au reflux.

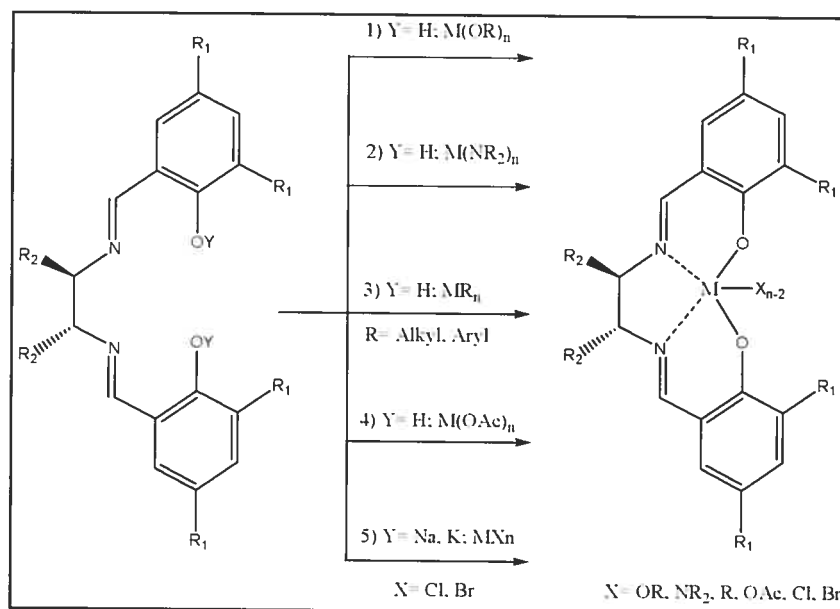
La purification du produit doit être soigneusement effectuée puisqu'elle peut conduire à sa dégradation. Afin d'éviter ce problème, il est recommandé d'utiliser une méthode de purification plutôt basée sur la cristallisation du produit.<sup>4</sup> Si la base de Schiff est insoluble dans l'hexane ou le cyclohexane, elle peut être purifiée en agitant le milieu réactionnel en présence d'un de ces deux solvants tout en ajoutant des solvants polaires tels que l'éther éthylique ( $\text{Et}_2\text{O}$ ) ou le dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) afin d'éliminer les impuretés. Les bases de Schiff sont généralement stables sous forme solide et elles peuvent être entreposées sans précaution particulière.



**Figure 1. Approche générale de synthèse des salens**

### 1.1.2 La complexation des salens

Les complexes métalliques de salen sont produits par la réaction d'une base de Schiff et d'un complexe métallique. Il existe essentiellement cinq voies différentes pour faire leur synthèse (Figure 2).<sup>4</sup>



**Figure 2. Approche générale de synthèse des métallo-salens**

La première voie implique l'utilisation d'un alkoxyde métallique ( $M(OR)_n$ ). Elle peut être facilement employée avec certains métaux des quatrième et cinquième périodes tels que le titane (Ti) et le zirconium (Zr) puisque leurs dérivés alkoxydes sont disponibles commercialement. Par contre, cette méthode n'est pas adaptée pour certains dérivés alkoxydes sensibles à l'humidité tels que les dérivés de la famille des lanthanides.

Les amides métalliques ( $M(NMe_2)_4$ ) sont aussi d'excellents précurseurs à la formation de complexes basés sur des métaux de la quatrième et de la cinquième période. La réaction se produit via l'élimination d'un proton acide phénolique et la formation de diméthylamine ( $NHMe_2$ ) gazeux.

Un complexe métal-salen peut aussi être préparé de façon propre et efficace à l'aide d'alkyle métallique ( $MR_n$ ). Une grande variété d'alkyle métallique est offerte commercialement tels que le triméthyl aluminium ( $AlMe_3$ ), le triméthyl gallium ( $GaMe_3$ ) et le triméthyl indium ( $InMe_3$ ). Cette voie de synthèse est particulièrement employée avec des complexes de type  $M(\text{mésityl})_n$  du fer, du manganèse, du vanadium et du cuivre.

Plusieurs complexes métal-salen peuvent être obtenus par le traitement d'une base de Schiff et d'un acétate métallique ( $M(OAc)_n$ ). Cette synthèse s'effectue généralement au reflux du solvant, en présence du sel métallique correspondant. Le Cu (cuivre), le Co (cobalt) et le Ni (nickel) sous leur forme  $M(OAc)_2$  sont souvent employés pour effectuer ce type de synthèse.

Il est aussi possible d'utiliser des halogénures métalliques tels que le tétrachlorure de titane ( $TiCl_4$ ) et le tétrachlorure de zirconium ( $ZrCl_4$ ) afin d'effectuer la synthèse par réaction directe. La cinquième voie (**Figure 2, Page 4**) consiste à faire une réaction en deux étapes, soit la déprotonation de la base de Schiff suivie de la réaction avec le métal de l'intermédiaire correspondant. La déprotonation des acides phénoliques s'effectue à l'aide d'une base de lithium tel que le méthyl lithium ( $MeLi$ ) ou le butyl lithium ( $BuLi$ ). Certains alkyles de lithium peuvent attaquer le groupement amine de la base de Schiff; il est donc recommandé d'effectuer la déprotonation en présence d'hydruure de sodium ( $NaH$ ) ou d'hydruure de potassium ( $KH$ ). Normalement, la déprotonation se produit rapidement à température ambiante, mais il a été établi qu'une augmentation de la température n'entraînait pas de décomposition.<sup>4</sup> Le solvant le plus souvent employé est le tétrahydrofurane (THF). Les complexes  $TiCl_4(THF)_2$ ,  $ZrCl_4(THF)_2$  ou  $VCl_3(THF)_3$  peuvent également être utilisés dans la réaction de déprotonation.

Nous venons de voir que les complexes métal-salen aussi appelés métallosalen, peuvent être facilement synthétisés. On les emploie notamment pour exploiter leurs propriétés oxydatives, en catalyse chimique tout comme en catalyse biologique. De plus,

certaines ont été reconnus pour leur propriété conductrice. Les sections suivantes traiteront des différentes applications.

### 1.1.3 Les métalloalènes utilisés en catalyse chimique

Un catalyseur est une substance qui augmente la vitesse d'une réaction sans en modifier le bilan thermodynamique. Le catalyseur se retrouve inchangé à la fin de la réaction même s'il a subi des modifications temporaires.

Les bases de Schiff sont capables de chélater divers métaux et de les stabiliser sous une variété d'états d'oxydation. Ils ont aussi la capacité de contrôler la performance du métal lors de transformations catalytiques. Les bases de Schiff sont donc des catalyseurs synthétiques qui sont énantiosélectifs pour un grand nombre de réactions chimiques. Elles ont été définies comme des ligands privilégiés par Jacobsen.<sup>5</sup>

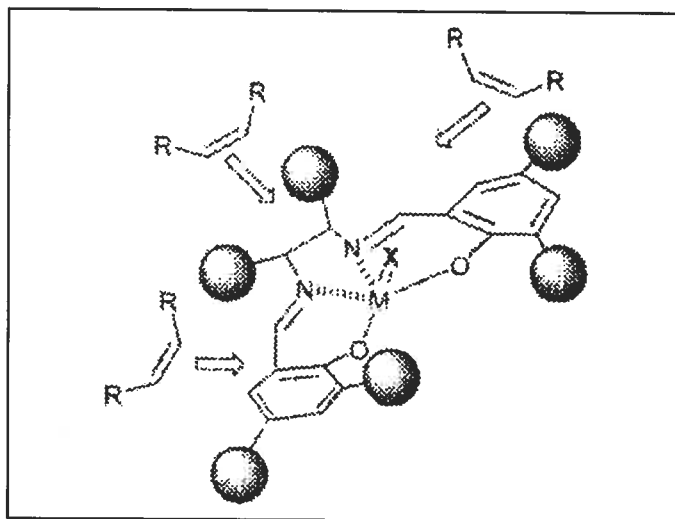
#### 1.1.3.1 L'effet des substituants et de la conformation de la base de Schiff

Tout d'abord, lors du design de la base de Schiff, il est essentiel de prévoir une structure efficace pour la catalyse chimique. L'activité catalytique est liée à l'encombrement stérique des substituants et à leurs effets électroniques.<sup>6,7</sup>

La coordination d'un métal avec une base de Schiff bidentate ou tridentate produit un complexe dimère ou saturé, particulièrement avec les premiers métaux de transition tels que le scandium (Sc), le titane (Ti) et le vanadium (V), qui ont tendance à se coordonner avec le ligand en produisant un complexe octaédrique. Lorsqu'une base de Schiff chirale forme un complexe saturé, il y a une diminution de l'efficacité du processus catalytique puisque les complexes saturés sont stables. Afin de prévenir cette situation, il est recommandé d'introduire des substituants volumineux à proximité du site de coordination tel que le groupement *ter*butyl placé en position *ortho* et *para* du phénol (**Figure 8, page**

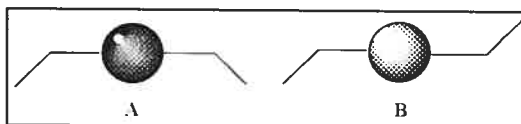
11). L'encombrement causé par celui-ci permet d'éviter la formation de complexe octaédrique inactif.

La structure des salens métalliques influence aussi la trajectoire d'approche du substrat lors de la réaction de catalyse chimique. L'approche normalement privilégiée étant orientée vers la moitié diamine (**Figure 3**).<sup>6,7</sup> Grâce à l'encombrement en position ortho et para du phénol, la trajectoire du substrat est orientée vers la moitié diamine du métallosalen.



**Figure 3. Trajectoire d'approche privilégiée par le substrat<sup>2</sup>**

Quelques M(salens) adoptent, à l'état solide, une conformation plane mais, en majorité, ils s'orientent sous une forme non-planaire représentant soit une ombrelle (**Figure 4A, Page 8**) ou un escalier (**Figure 4B, Page 8**).<sup>6,7</sup> L'angle que produit la conformation escalier est proportionnel à la grosseur du métal, à son état d'oxydation, à la présence ou à l'absence de ligand axial et à la nature des substituants. Comme nous le verrons un peu plus loin, les conformations non-planaires sont essentielles à l'activité catalytique et à la conduction électrique des métallosalens.<sup>8-10</sup>

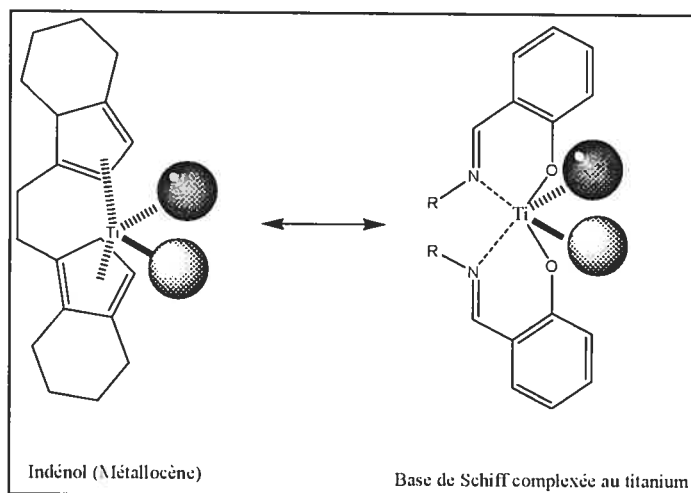


**Figure 4. Différentes conformations du complexe de salen**

### 1.1.3.2 Complexes de titane et de vanadium

Bien que l'effet des substituants et la conformation de la base de Schiff jouent un rôle majeur sur l'activité catalytique, le choix du métal précurseur est aussi primordial afin de conserver ces propriétés catalytiques.<sup>2,11</sup>

Un système capable de mimer les propriétés de coordination des métallocènes devrait pouvoir effectuer les mêmes réactions. Les bases de Schiff ont été largement développées en se basant sur ce principe.<sup>12</sup> Leurs propriétés de coordination et leur capacité à former un environnement très similaire aux métallocènes en font un outil très approprié comme catalyseur pour la polymérisation (**Figure 5**).

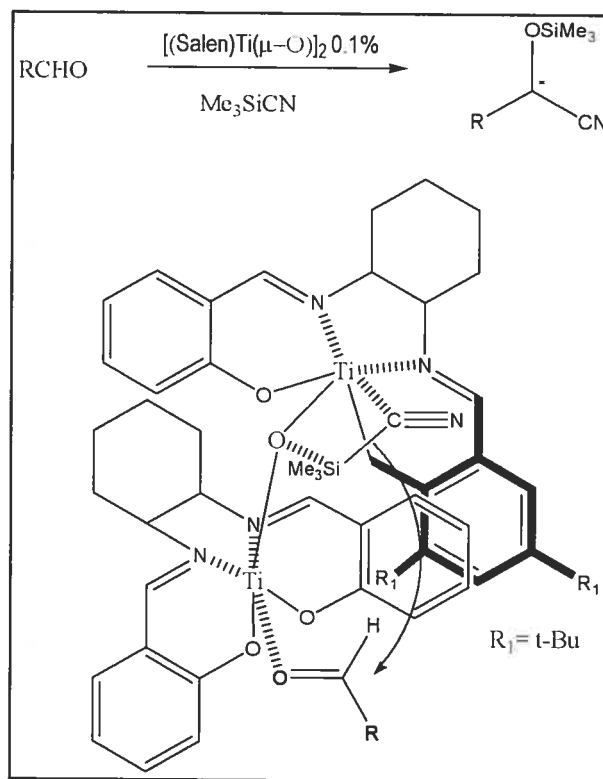


**Figure 5. Structure de l'indénol et d'une base de Schiff complexée au titane**

Les bases de Schiff tridentates chirales de vanadium activent l'oxydation asymétrique de sulfites, de disulfites et de thioacétals.<sup>13</sup> De plus, elles attirent l'attention en

chimie verte puisqu'elles agissent comme agents de détoxification environnementale et biologique en captant les radicaux libres (chimie propre).<sup>14</sup>

Certains complexes du titane ont clairement démontré leur efficacité en addition énantiosélective combinée avec du  $\text{Me}_3\text{SiCN}$  (cyanotriméthylsilane) pour les aldéhydes et les cétones.<sup>15</sup> L'étude détaillée du mécanisme d'action montre que l'espèce active de la réaction est un complexe bimétallique (**Figure 6**).<sup>16</sup> Ce comportement est aussi rencontré avec les complexes du chrome (Cr) et du cobalt (Co). Il est très avantageux lorsque l'activation nucléophile ou électrophile est nécessaire. Les transformations redox basées sur des complexes de vanadium et de titane sont aussi bien connues.<sup>17</sup>



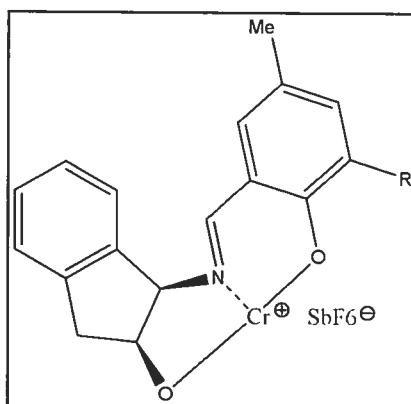
**Figure 6.** Le catalyseur  $\text{Ti}(\text{salen})$  utilisé en addition énantiosélective via l'activation électrophile et nucléophile.



### 1.1.3.3 Complexes de manganèse (Mn) et de chrome

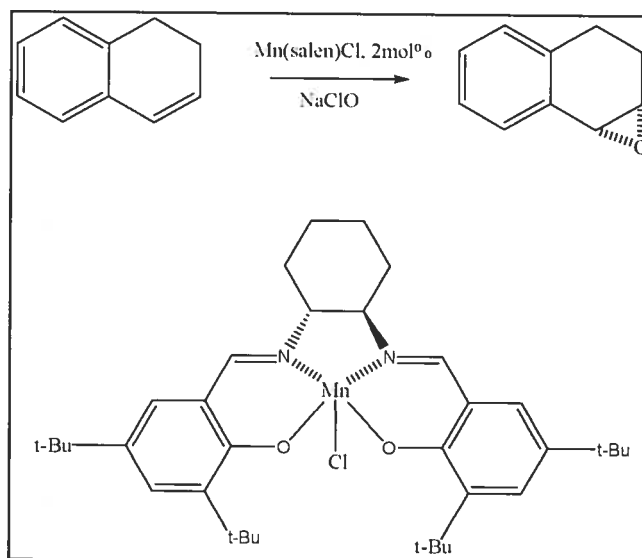
La première application des complexes de Cr(salens) achiraux en catalyse a été décrite en 1985 par Kochi.<sup>18</sup> L'étude de ces synthèses ainsi que de leurs mécanismes permet d'envisager plusieurs développements dans cette voie.

Les bases de Schiff tridentates et tétradentates achirales de chrome produisent des ligands stables en catalyse polymérique. L'ajout de groupements volumineux en position ortho du phénol est la clé de la grande activité de ce type de complexe. Jacobsen a préparé plusieurs complexes de chrome tridentate (**Figure 7**) agissant comme catalyseurs pour la réaction de Diels-Alder.<sup>19</sup>



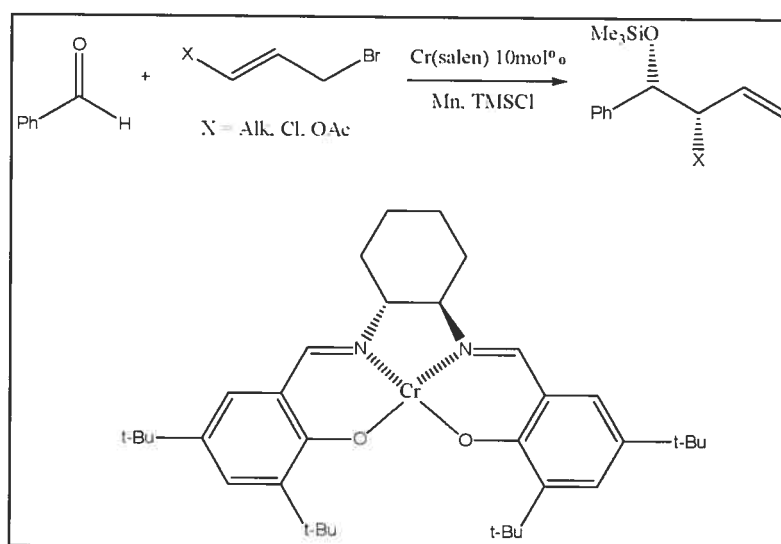
**Figure 7. Le Cr(salen); catalyseur énantiosélectif pour la réaction Diels-Alder**

Les complexes Mn(III)(salens) chiraux ont été décrits par Jacobsen et Katsuki comme des catalyseurs fort utiles pour l'époxydation asymétrique d'oléfines. L'oxydation se produit en présence de phénylperiodate (PhIO) ou d'autres dérivés tels que l'hypochlorite de sodium (NaClO), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou le métaperiodate de sodium (NaIO<sub>4</sub>) (**Figure 8, Page 11**). Une étape intermédiaire entre en jeu au cours de cette réaction, c'est-à-dire la formation du complexe Mn(O)(salen). De plus, l'analyse du mécanisme de la réaction suggère que la conformation en escalier est essentielle pour le succès de la réaction.<sup>20</sup>



**Figure 8. Le complexe  $\text{Mn(salen)Cl}$ ; catalyseur énantiosélectif d'époxydation**

La version énantiosélective de la réaction de Nozaki-Hiyama (**Figure 9**) utilise une quantité catalytique de  $\text{Cr(salen)}$ .<sup>21</sup> L'analyse détaillée de la réaction montre que l'agrégation entre différentes molécules de  $\text{Cr(salen)}$  est responsable de l'énantiosélectivité obtenue.



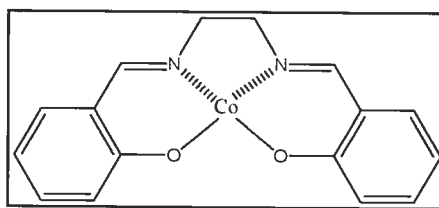
**Figure 9. Le complexe  $\text{Cr(salen)}$ ; catalyseur redox énantiosélectif et diastéréosélectif**

#### 1.1.3.4 Complexes de fer

Certaines enzymes, telles que les porphyrines sont complexées au fer (Fe). Par exemple, les cytochromes P450 catalysent différentes réactions d'oxydation, de réduction et d'isomérisation.<sup>22,23</sup> Étant donnée la très grande similarité entre les porphyrines et les salens, plusieurs recherches ont été faites sur des bases de Schiff complexées avec le fer afin de promouvoir différentes réactions catalytiques.<sup>22,23</sup>

#### 1.1.3.5 Complexes de cobalt pour l'ouverture d'époxyde

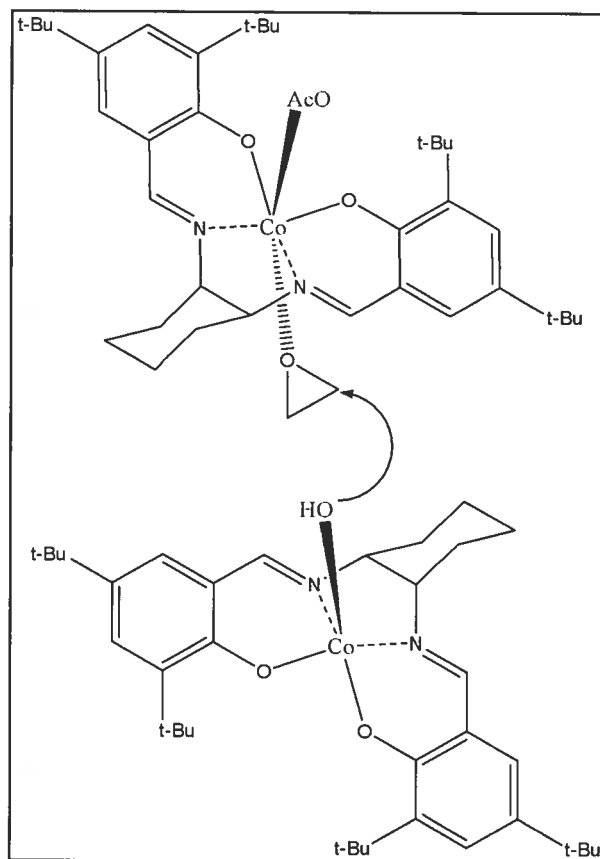
La structure des métallosalens comprend une cavité qui permet de recevoir un petit ligand tel qu'une molécule d'oxygène.<sup>24</sup> Par exemple, le Co(salen) (**Figure 10**) peut se lier à l'oxygène grâce à sa géométrie de coordination en pyramide à base carrée. Cette découverte a grandement contribué à stimuler la recherche afin d'obtenir des ligands capables de se lier sélectivement à l'oxygène de façon réversible et d'effectuer l'oxydation catalytique de substrats organiques.<sup>25</sup> Par exemple, le Co(salen) (**Figure 10**) est utilisé pour l'oxydation de phénols, d'indoles, de flavonols et d'amines. De plus, la copolymérisation de certains Co(salen) avec un matériau poreux permet le transport d'oxygène de façon réversible.<sup>26</sup>



**Figure 10. Le complexe Co(salen)**

Les complexes métallosalens de cobalt sont aussi employés pour l'ouverture d'époxydes. Le Co(III)(salen) (**Figure 11, Page 13**) est utilisé en milieu aqueux dans ce but.<sup>27</sup> L'arrangement spatial spécifique a été décrit par Jacobsen comme un système orienté

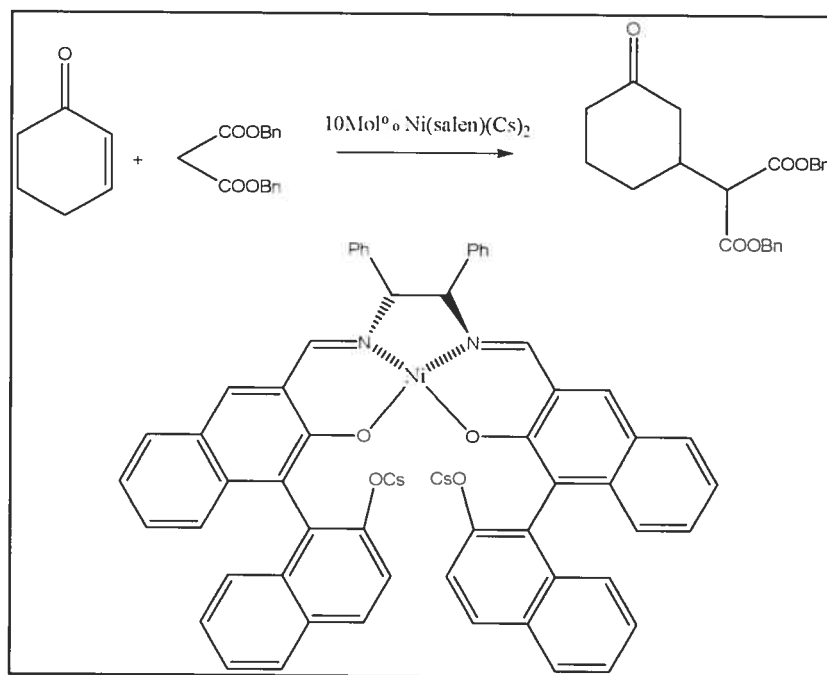
de la « tête vers la queue ». On retrouve souvent cette organisation particulière avec les complexes dimériques de salen. Elle tend à minimiser l'effet stérique entre deux molécules.



**Figure 11.** Arrangement de type « tête à queue » entre deux unités de salen

#### 1.1.3.6 Complexes de nickel et de cuivre

La géométrie de coordination plane des complexes de type Ni(salen) ne favorise pas leurs applications en catalyse. Par contre, elle permet à d'autres métaux de se lier aux complexes. Le complexe Ni(salen) (**Figure 12, Page 14**) représente un bon exemple de structure possédant un métal différent et qui agit comme catalyseur bifonctionnel.<sup>28</sup>



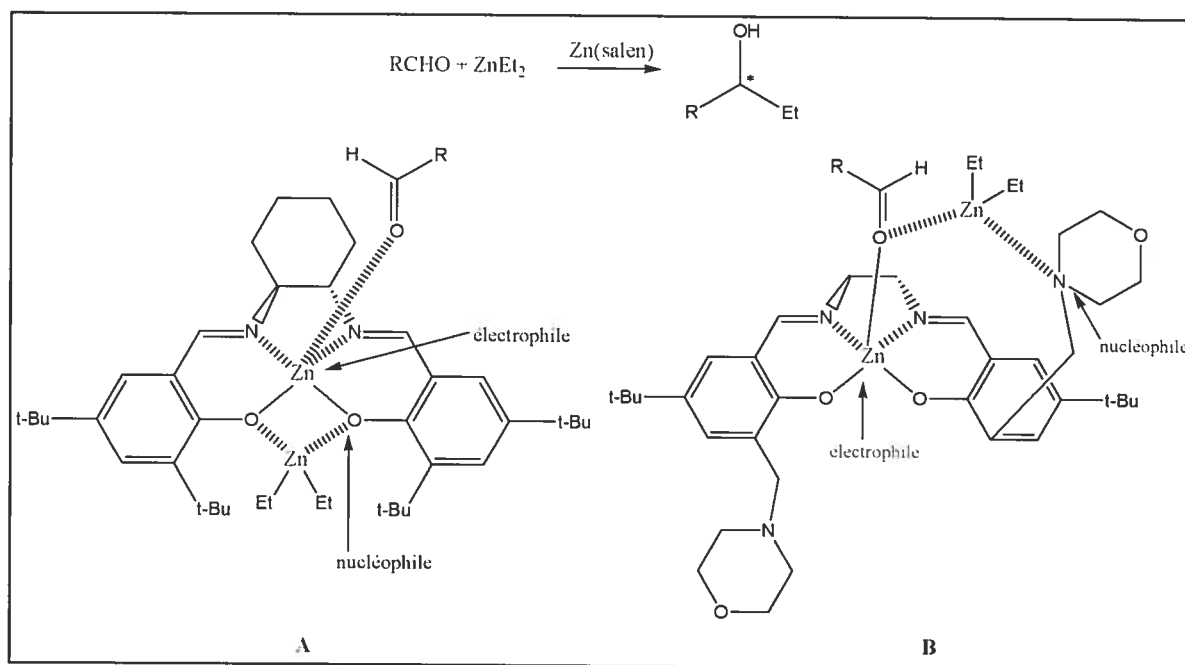
**Figure 12. Complexe bimétallique dérivé du Ni(salen) utilisé comme catalyseur pour la réaction d'addition de Michael.**

Les complexes de cuivre trouvent, quant à eux, plusieurs applications particulièrement pour le transfert d'azote grâce à la capacité du cuivre d'être réduit et donc de passer de sa forme Cu(II) à sa forme Cu(I) dépendant de la source d'azote disponible.<sup>29</sup> Leur géométrie ainsi que leurs propriétés rendent le métal susceptible de se chélater à différents ions.<sup>30</sup>

#### 1.1.3.7 Complexes de zinc

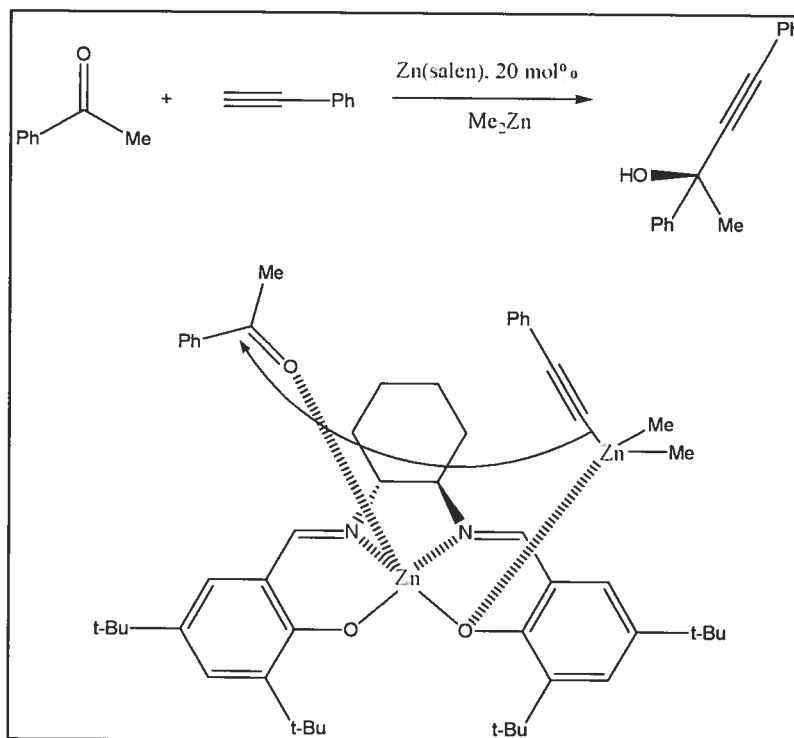
Les complexes chiraux Zn(salen) (**Figure 14, Page 16**) présentent d'intéressantes propriétés photophysiques.<sup>31</sup> Étant donné qu'ils sont stables en solution aqueuse, ils sont employés en milieu biologique. Leur capacité à se coordonner avec des sels, même après leur chélation peut être avantageusement utilisée en catalyse chimique (**Figure 13, Page 15**).<sup>32,33</sup> Par exemple, les oxygènes de la figure 13a se coordine avec le Zn et active l'addition d'un groupement éthyl sur l'aldéhyde. À la figure 13b, ce sont plutôt les bases de

Lewis, en position ortho du phénol, qui activent l'addition d'un groupement éthyl sur l'aldéhyde. Dans les deux cas, le métallosalen agit comme catalyseur à activité bifonctionnel.



**Figure 13. Formation d'un catalyseur à activité bifonctionnel par la coordination d'un Zn(salen) avec le ZnEt<sub>2</sub> (diéthylzinc)**

Ces salens peuvent promouvoir l'addition de réactifs organométalliques comme la réaction d'alkylation de cétone (**Figure 14, Page 16**). L'addition du réactif ZnMe<sub>2</sub> (diméthylzinc) à une cétone peut être réalisée en utilisant le complexe Zn(salen) comme catalyseur afin de former un stéréocentre quaternaire.<sup>4</sup> Premièrement, on mélange le ZnMe<sub>2</sub> avec l'alcyne afin de former un alcénure de zinc. On ajoute ensuite le salen puis la cétone. Cette réaction se fait à la température ambiante puisque l'augmentation de la température fait diminuer l'excès énantiomérique et la diminution de la température fait diminuer le rendement.<sup>4</sup>

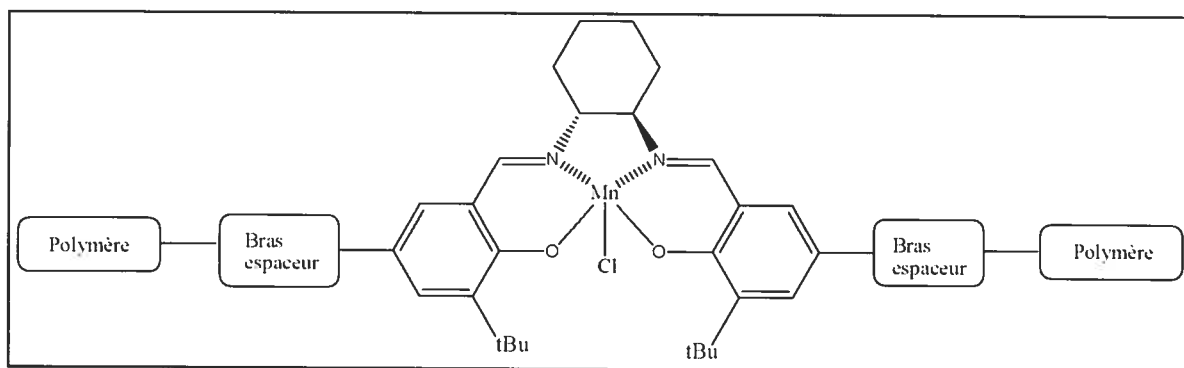


**Figure 14. L'alkylation énantiosélective de la cétone s'effectue en présence d'un catalyseur de type Zn(salen)**

#### 1.1.3.8 Les métalloalènes soutenus par une chaîne polymérique

Comme nous venons de le voir, de nombreux progrès ont été accomplis dans le développement d'une variété de métalloalènes catalytiquement actifs. Beaucoup d'efforts ont aussi été menés afin de développer des analogues polymériques à ces catalyseurs. Lorsque ces molécules actives sont soutenues par une structure polymérique, elles offrent de nombreux avantages et réduisent au minimum les inconvénients inhérents aux métalloalènes. En effet, la facilité avec laquelle on peut manipuler, séparer et réutiliser ces supports polymériques catalytiques font de ceux-ci un sujet de recherche plus qu'intéressant.<sup>8,34</sup>

Par exemple, le catalyseur de Jacobsen (**Figure 8, page 11**) est soluble, instable en présence d'oxydant et relativement cher. Il n'est donc pas surprenant de constater que plusieurs recherches sont axées sur la production d'analogues polymériques capables de contourner ces inconvénients tout en conservant les propriétés catalytiques des métalloalènes d'origine.<sup>10,35,36</sup> En attachant ces molécules actives à une chaîne polymérique, on espace les centres métalliques les uns des autres ce qui minimise la formation de dimères inactifs. Des analogues polymères ont donc été réalisés en ce sens en ajoutant de part et d'autre du métalloalène un groupement vinylique agissant comme bras espaceur.<sup>34,37</sup> Par la suite, cette nouvelle molécule est réticulée à une structure polymérique (par exemple le polystyrène ou le polyméthacrylate) conduisant à la formation d'un polymère hétérogène insoluble qui est réutilisable (**Figure 15**).<sup>8,38</sup> La faible quantité de métalloalène immobilisée sur la chaîne polymérique permet aussi de minimiser les coûts de façon considérable.

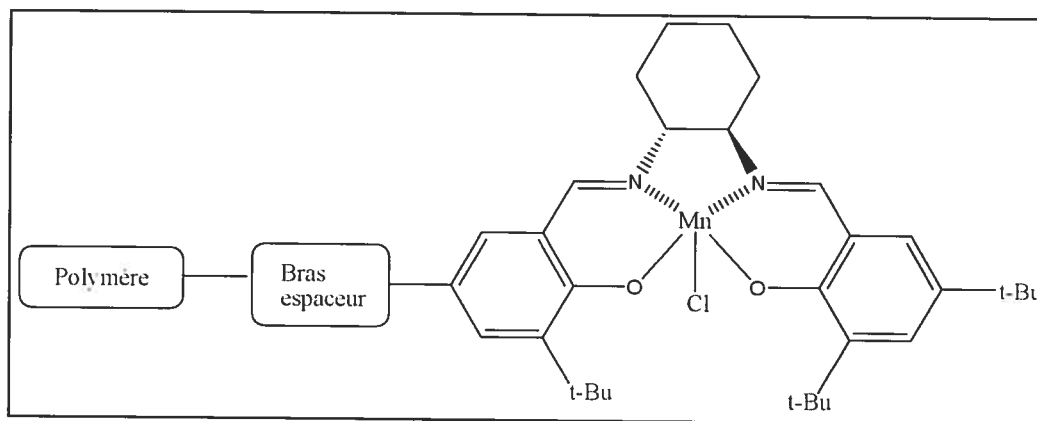


**Figure 15. Métalloalène réticulé à une structure polymérique**

Bien que ces polymères aient démontré une activité catalytique, l'énantiosélectivité de la réaction d'époxydation de Jacobsen est inférieure à celle obtenue avec le catalyseur (polymère = 1-26%, catalyseur = 65-72%).<sup>39</sup> La réticulation du métalloalène sur la chaîne polymérique rend le changement de conformation difficile, ce qui réduit considérablement l'énantiosélectivité de l'analogue polymérique.<sup>39</sup> Pour pallier à ce problème, des chercheurs explorent la possibilité d'attacher le métalloalène chiral par une liaison covalente à une



chaîne polymérique produisant plutôt un polymère greffé (**Figure 16.**)<sup>9,10</sup> Le métallosalen se trouvant par le fait même libre de mouvement et donc propice aux changements de conformation. De plus, l'énantiosélectivité de la réaction serait avantageée lorsque le métallosalen est fixé à la chaîne polymérique par le carbone en position para du phénol (61-91%) comparativement aux positions méta et ortho (0-7%).<sup>11</sup>



**Figure 16. Métallosalen greffé à une structure polymérique**

#### 1.1.4 Les métallosalens utilisés en catalyse biologique

La catalase et les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloprotéines d'oxydoréduction contenant dans leur site actif un atome de cuivre/zinc, de fer ou de manganèse permettant la dismutation des radicaux superoxydes (SO) en produits non-radicalaires.<sup>40,41</sup> On décrit la réaction de dismutation comme étant la réaction entre deux molécules semblables conduisant à la formation de deux produits différents. Les SOD catalysent la réaction d' $O_2^{\cdot -}$  en  $H_2O_2$  et en oxygène selon les équations 1 et 2, tandis que la catalase permet la transformation de deux molécules  $H_2O_2$  en oxygène et en eau selon l'équation 3. Dans les équations ci-dessous,  $M^{n+1}$  représente la métalloenzyme dans son état oxydé et  $M^n$  dans son état réduit.

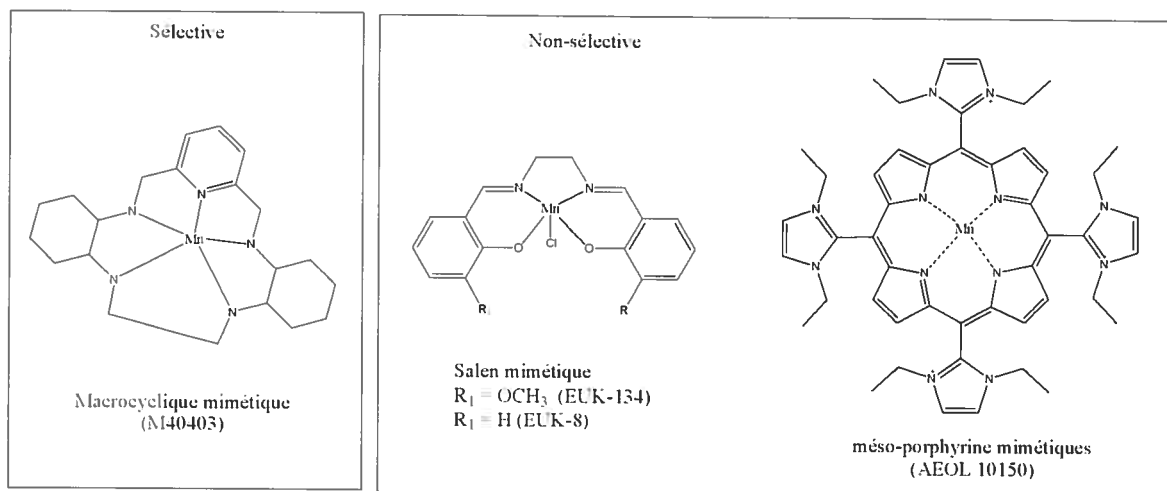


#### 1.1.4.1 Les mimétiques de la superoxyde dismutase

Chez un individu en bonne santé, la quantité de radicaux libres produite est contrôlée par les enzymes SOD. Par contre, chez un individu malade, cet équilibre est perturbé et il se produit un déséquilibre entre la quantité de SO formée et la capacité des SOD à les éliminer. Ceci conduit à des dommages cellulaires, de l'inflammation, des désordres cardiovasculaires, pulmonaires ou neurodégénératifs.<sup>42,43</sup>

L'utilisation de SOD et de catalase comme agents thérapeutiques, pour atténuer l'effet induit par l'excès de SO, a eu un succès mitigé.<sup>44</sup> Au premier abord, on pourrait se demander quels sont les avantages à employer un mimétique de la superoxyde dismutase (SODm) à la place d'une SOD naturelle dans la lutte contre les radicaux libres. Considérant la multitude de détériorations causées par un stress oxydatif, on attribue un très large éventail d'applications aux SODm. Les résultats de nombreuses recherches démontrent que l'utilisation de SODm comme agent thérapeutique a plusieurs avantages sur les SOD et sur la catalase incluant la capacité d'accéder au milieu intracellulaire, un temps de demi-vie supérieur dans le sang et un faible coût de fabrication.<sup>45-52</sup> De plus, leur taille et leurs charges peuvent être exploitées afin de cibler les sites cellulaires spécifiques.<sup>51-54</sup>

Il existe au moins trois classes d'antioxydants contenant des métaux comme catalyseurs biologiques; les macrocycliques, les métalloporphyrines et les salens (**Figure 17, Page 20**). On peut diviser ces trois classes en deux groupes selon qu'ils sont sélectifs ou non-sélectifs des radicaux  $\text{O}_2^{\cdot -}$  présents *in vitro*.

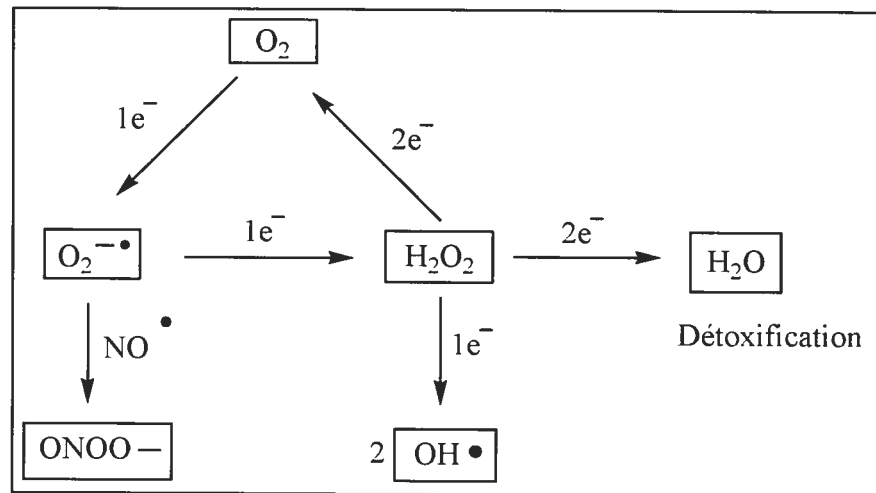


**Figure 17. Différentes classes d'antioxydants catalytiques**

**(La sélectivité se réfère seulement à la réaction *in vitro* avec les superoxydes versus les peroxydes d'hydrogène ou les peroxynitrites.)**

#### 1.1.4.2 Les propriétés antioxydantes des macrocycliques

C'est par cinq liaisons de coordination que le métal central est attaché aux macrocycles. Ceux-ci ne peuvent transférer qu'un seul électron, ce qui rend cette classe d'antioxydants sélective des radicaux  $O_2^{\cdot -}$  *in vitro* (Figure 18, Page 21).<sup>45</sup> Durant la réaction de dismutation, l'atome de manganèse passera alternativement de sa forme oxydée à sa forme réduite et donc de sa forme Mn(III) à sa forme Mn(II). Il est difficile de juger de la sélectivité d'un antioxydant en milieu biologique puisque plusieurs autres produits endogènes peuvent participer à l'échange d'électrons. On ne peut donc pas affirmer que les macrocycles interagissent exclusivement avec les radicaux  $O_2^{\cdot -}$  en milieu biologique.



**Figure 18. Les antioxydants effectuent la détoxification des espèces réactives du milieu**

#### 1.1.4.3 Les propriétés antioxydantes des métalloporphyrines

De façon analogue aux salens, le métal central des métalloporphyrines est coordonné à quatre ligands axiaux. Par contre, les quatre ligands du métal central des métalloporphyrines sont azotés. Les métalloporphyrines sont non-sélectives aux superoxydes puisqu'elles servent aussi d'antioxydants contre les peroxydes d'hydrogène, les peroxynitrites et les peroxydes lipidiques.<sup>46-50</sup> Leur activité catalase est attribuée à leur capacité d'atteindre des niveaux d'états d'oxydation supérieurs tels que Mn(IV) ou Mn(V). En général, les métalloporphyrines possèdent une activité mimétique de la SOD et de la catalase élevée.

#### 1.1.4.4 Les propriétés antioxydantes des salens

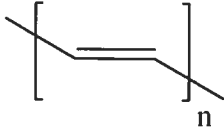
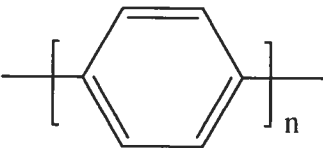
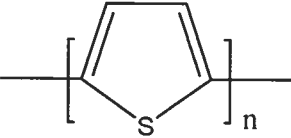
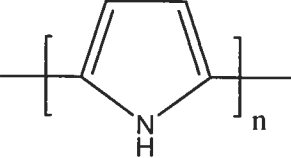
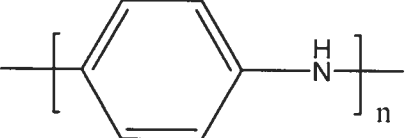
Tel que vu précédemment, cette classe d'antioxydants, possède un métal central coordonné à la fois à deux atomes d'oxygène et d'azote. La coordination du manganèse par quatre ligands axiaux conduit à la formation de plusieurs états de valences, ce qui contribue à sa nature non-sélective. Les complexes Mn(III)(salen) ont démontré des propriétés

oxydantes avec les superoxydes, les peroxydes d'hydrogène et réagissent avec les peroxydinitrites et les peroxydes lipidiques.

Cette classe d'antioxydants retient beaucoup l'attention puisque son activité SODm est contestée.<sup>51,52</sup> Quelques études biologiques sur les complexes EUK-8 et EUK-134 (**Figure 17, Page 20**) ont été publiées. Le complexe EUK-8 a été testé pour une large variété de problèmes liés aux stress oxydatifs. Cette molécule a montré son efficacité, entre autres, dans le cas de désordre neurologique, de la maladie d'Alzheimer et de la maladie de Parkinson.<sup>51,54,53</sup> De plus, elle protège les fonctions pulmonaires en cas de syndrome respiratoire chez le porc. Par contre, l'étude des propriétés oxydatives du EUK-8 indique une très faible activité catalytique.<sup>55</sup> Selon l'étude spectrophotométrique et électrochimique des complexes Mn(III)(salens), ils ne présenteraient pas d'activité SODm.<sup>56</sup> Seul le EUK-134 semble posséder une activité mimétique de la SOD et de la catalase.<sup>57</sup> On peut donc en conclure que les Mn(III)(salens) ne sont pas vraiment des catalyseurs à SODm mais possèdent tout de même une activité biologique. Leurs mécanismes d'action restent encore obscurs et intriguent beaucoup la communauté scientifique.

### 1.1.5 Les métallo-salens utilisés pour leur propriété conductrice

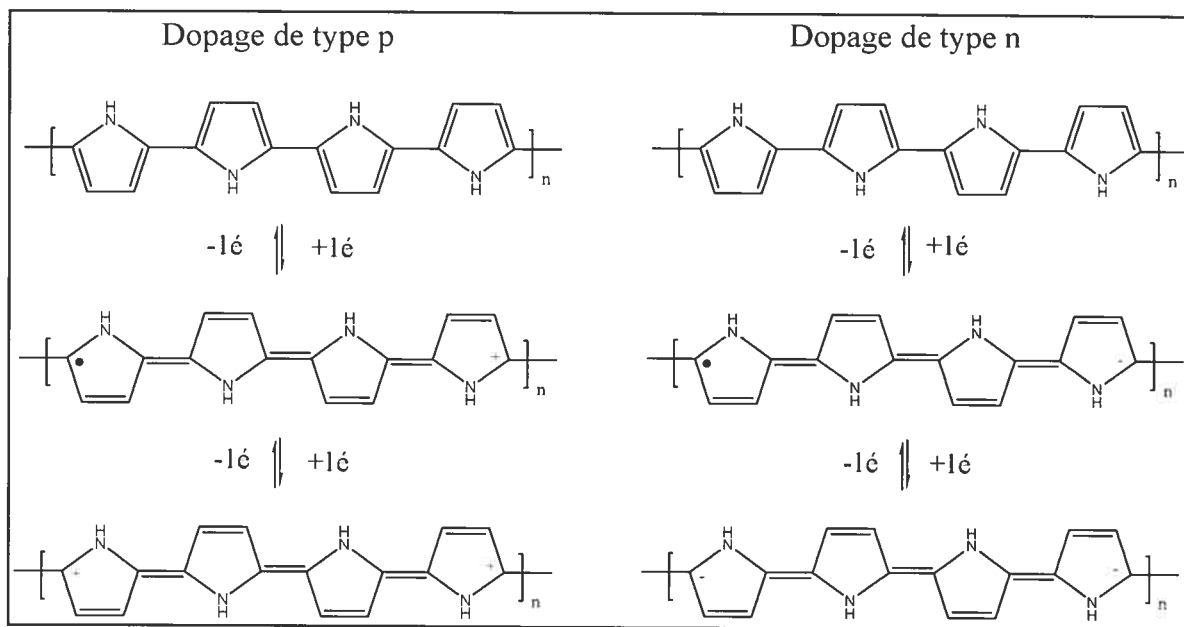
Bien que la conductivité électrique des polymères ne soit pas encore entièrement comprise, certaines caractéristiques structurales sont connues pour la favoriser. Prenons par exemple, le premier polymère conducteur, le polyacétylène découvert en 1977 par Heeger, MacDiarmid et Shirakawa<sup>58</sup> ainsi que le poly(paraphénylène)<sup>59</sup>, le polythiophène<sup>60</sup>, le polypyrrole<sup>60</sup> et le polyaniline<sup>60</sup> (**Figure 19, Page 23**). Tous ces polymères possèdent une caractéristique commune, soit la présence d'un système  $\pi$ -conjugué le long de la chaîne principale.

Polymère	Structure	Conductivité (S/cm)
Polyacétylène		$10^2$ - $10^5$
Poly(paraphénylène)		$10^2$ - $10^4$
Polythiophène		$10^1$ - $10^3$
Polypyrrole		$10^1$ - $10^3$
Polyaniline		$1$ - $10^2$

**Figure 19. Conductivité électrique de différents polymères conducteurs<sup>61</sup>**

L'oxydation ou la réduction partielle des polymères conjugués, communément appelée dopage, peut transformer un polymère isolant en polymère conducteur. Il existe principalement deux types de dopage soit le dopage p, qui fait intervenir un défaut électronique positif dans la chaîne principale (forme oxydée du polymère), soit le dopage n, qui fait intervenir un défaut électronique négatif (forme réduite du polymère) (**Figure 20, Page 24**).<sup>62</sup> C'est le transport de ces défauts de charge dans la chaîne principale et

également entre les chaînes du polymère qui serait responsable de la conductivité électronique observée lors de l'application d'un champ électrique.



**Figure 20. Représentation du polypyrrole soumis au dopage de type p et n**

#### 1.1.5.1 Mécanisme de la conduction; la théorie des bandes

Les atomes d'un solide sont si proches les uns des autres que les orbitales d'un grand nombre d'entre eux fusionnent pour former un continuum de niveaux d'énergie qui s'étend sur tout le solide. L'énergie des orbitales liantes tend à diminuer, alors que celle des orbitales antiliantes augmente en fonction de la distance interatomique. De plus, les niveaux d'énergie correspondant aux orbitales tendent à s'étaler autour d'un niveau moyen, on parle alors de bandes d'énergie plutôt que de niveaux. La bande correspondant à l'étalement de l'orbitale  $\sigma$  antiliante est appelée bande de conduction tandis que la bande correspondante à l'étalement de l'orbitale  $\pi$  liante est appelée bande de valence (**Figure 21, Page 26**).

Dans le cas des matériaux isolants (conductivité inférieure à  $10^{-8}$  S/cm), la bande de valence et la bande de conduction sont séparées par une bande interdite ( $E_g$ ), qui correspond à une énergie supérieure à 2 eV (**Figure 21, Page 26**). D'après la théorie des bandes<sup>62</sup>, seuls les électrons excités dans la bande de conduction peuvent participer à la conduction électrique. Les électrons doivent donc franchir cette bande interdite afin de passer de la bande de valence à la bande de conduction. Or, à la température ambiante, très peu d'électrons ont assez d'énergie pour subir cette transition d'où la très faible conduction électrique observée chez ces matériaux.

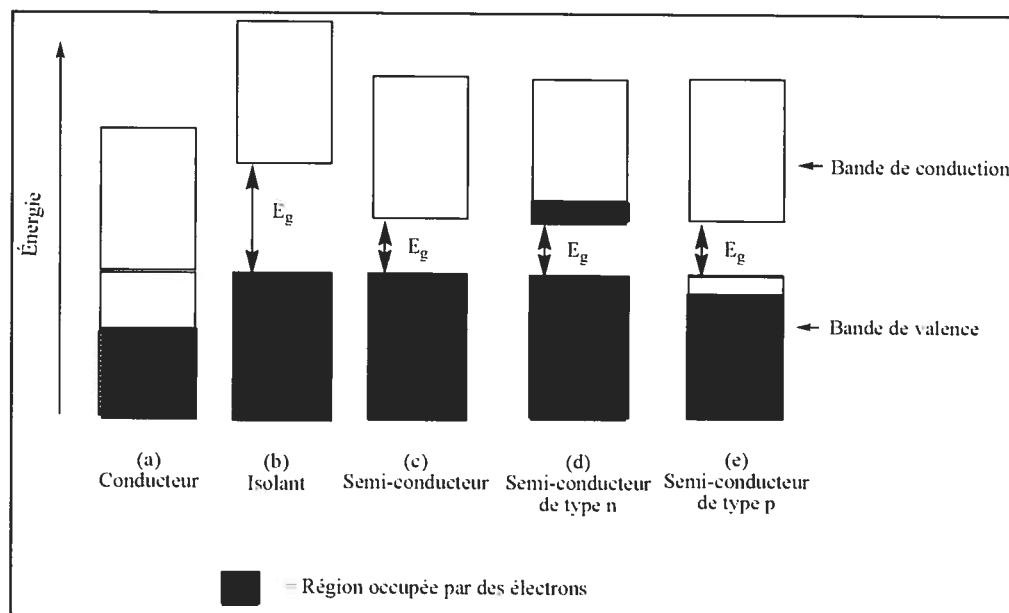
Dans le cas des semi-conducteurs (conductivité comprise entre  $10^{-7}$  et  $10^{-1}$  S/cm), la largeur de la bande interdite a une énergie voisine de 1 eV. À la température ambiante, le passage de plusieurs électrons de la bande de valence à la bande de conduction est alors possible. Le nombre important d'électrons libres est responsable de la conduction observée dans les semi-conducteurs. Toujours en se basant sur la théorie des bandes, un semi-conducteur de type n possède quelques électrons dans la bande de conduction tandis que les semi-conducteurs de type p ont un trou électronique dans la bande de valence (**Figure 21, Page 26**).

Dans le cas des conducteurs (conductivité supérieure à  $10^2$  S/cm), la situation est très différente puisque leurs atomes possèdent une bande de valence partiellement remplie. Pour simplifier, l'énergie de la bande interdite des conducteurs est nulle ce qui permet donc le passage d'électrons vers la bande de conduction sans que ceux-ci aient à franchir une barrière d'énergie (**Figure 21, Page 26**). Les électrons sont donc libres de circuler sans obstacle, ce qui confère aux conducteurs des conductivités élevées.

Pour les isolants et les semi-conducteurs, une augmentation de température favorise les sauts d'électrons vers la bande de conduction ce qui a comme conséquence d'augmenter la conductivité de ces matériaux. Par contre, l'augmentation de la température est légèrement néfaste sur la conductivité des matériaux conducteurs puisque, d'une part, elle



n'augmente pas le nombre d'électrons libres et, d'autre part, elle diminue la mobilité des électrons par une augmentation du désordre dans le matériau.



**Figure 21. Schéma explicatif de la théorie des bandes d'énergie pour des matériaux (a) conducteurs, (b) isolants, (c) semi-conducteurs, (d) semi-conducteurs de type n et (e) semi-conducteurs de type p<sup>62</sup>**

### 1.1.5.2 Les bases de Schiff et les métalloalens aux propriétés conductrices

Les bases de Schiff et les salens sont utilisées sous leur forme polymérique pour leurs propriétés conductrices. La conductivité d'un polymère est déterminée par trois types de transport de charges différentes : le transport de charges intrachaîne qui se produit tout au long de la chaîne conjuguée du polymère, le transport interchaîne par saut électronique entre chaînes polymériques d'un même domaine de conductivité et le transport de charges interdomaines par saut électronique entre domaines voisins.<sup>63</sup>

Le transport intrachaîne est limité par les impuretés et les défauts se trouvant sur la chaîne polymérique. Le transport interchaîne dépend quant à lui de la force de couplage

entre les chaînes polymériques. Le transport interdomaine implique de larges sauts entre deux domaines d'où la distance devient un facteur d'importance. Ces trois types de transport de charges déterminent la conductivité mais ce sont les transports interchaînes et interdomaines qui limitent la conductivité. Il est donc nécessaire de favoriser les transports interchaîne et interdomaine afin d'augmenter la conductivité macroscopique.<sup>63</sup> Les structures polymériques incorporant des métaux de transition, comme les salens, limitent la conductivité de type intrachaîne puisque les métaux présents tout au long de la chaîne segmentent la conductivité en absorbant la charge. Les électrons voyagent sur la chaîne conjuguée du polymère, puis sont absorbés par le métal du métallosalen qui agit, en quelque sorte, comme un agent dopant de type p jusqu'à ce que le métal ait atteint son degré d'oxydation maximal. Le transport de charges est, dans ce cas-ci, plutôt dominé par les interactions interchaînes.<sup>64</sup>

Les interactions entre les chaînes polymériques sont essentielles pour obtenir une conductivité élevée et plusieurs recherches vont dans ce sens.<sup>64,65</sup> Certaines recherches récentes montrent l'importance des agrégats- $\pi$  entre les chaînes conjuguées.<sup>66,67</sup> À l'intérieur de ces agrégats, les polymères sont en communication électronique directe les uns avec les autres à l'aide de liaisons  $\pi$  cofaciales entre les cycles aromatiques ou les chaînes conjuguées. La présence de structures segmentées par les complexes semble faciliter la formation d'agrégats- $\pi$  probablement en limitant la délocalisation intrachaîne.<sup>66,67</sup> De nombreuses études sur les polymères conducteurs sont en cours. Malgré tout, bien des facteurs relatifs à la conductivité nous échappent. Voyons donc quelques exemples de salen conducteur.

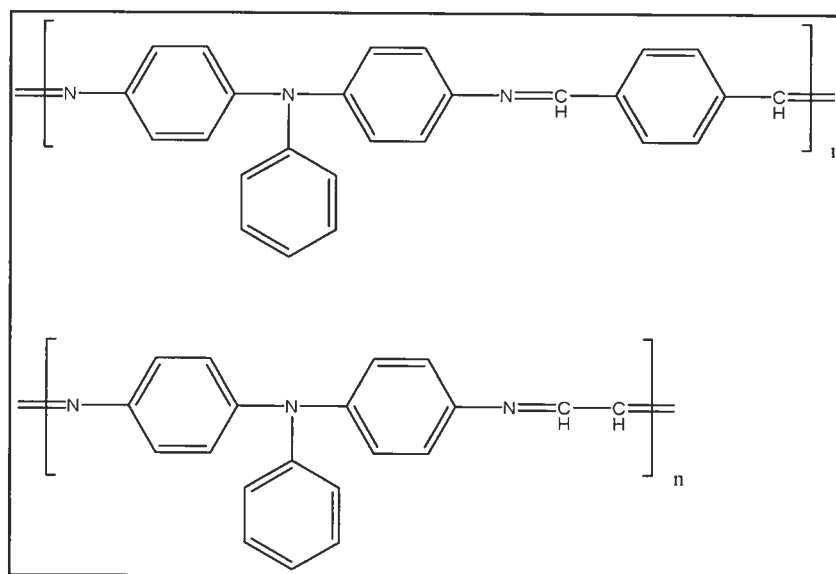
### 1.1.5.3 Fabrication de films polymériques conducteurs

#### 1.1.5.3.1 *Poly-base de Schiff*

Les poly-bases de Schiff ou les polyazométhines aromatiques constituent une classe de polymères conjugués particulièrement intéressante en raison de leur stabilité thermique

semblable aux polyamides, leurs propriétés en optique non-linéaire, leur facilité à former des fibres ainsi que pour leur conductivité électrique.<sup>68-71</sup> Par contre, leur faible solubilité dans les solvants organiques limite leurs applications pratiques.

Quelques groupes de recherche ont synthétisé des polyazométhines conductrices solubles en insérant des chaînes alkyles ou en insérant un groupement soluble dans le squelette polymérique.<sup>71</sup> Par exemple, deux poly-bases de Schiff conjuguées, synthétisées par polycondensation d'unités 4,4'-diamino-triphénylamine et de dialdéhydes, sont représentées à la figure suivante. Ces polymères sont solubles dans les solvants polaires et non-polaires.<sup>72</sup> Le 4,4'-diamino-triphénylamine a été choisi afin de réduire la rigidité conformationnelle de ces polymères.<sup>72</sup>

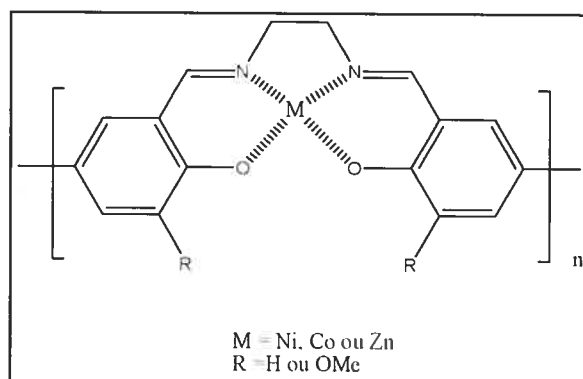


**Figure 22. Poly-bases de Schiff conductrices**

#### 1.1.5.3.2 Polymétallosalen

Tel que mentionné précédemment, l'atome métallique des métallosalens (**Figure 23, Page 29**) participe directement à l'état redox du polymère et à la conductivité électrique non seulement durant la polymérisation, mais aussi à l'état solide.<sup>73</sup> Par contre, il semblerait

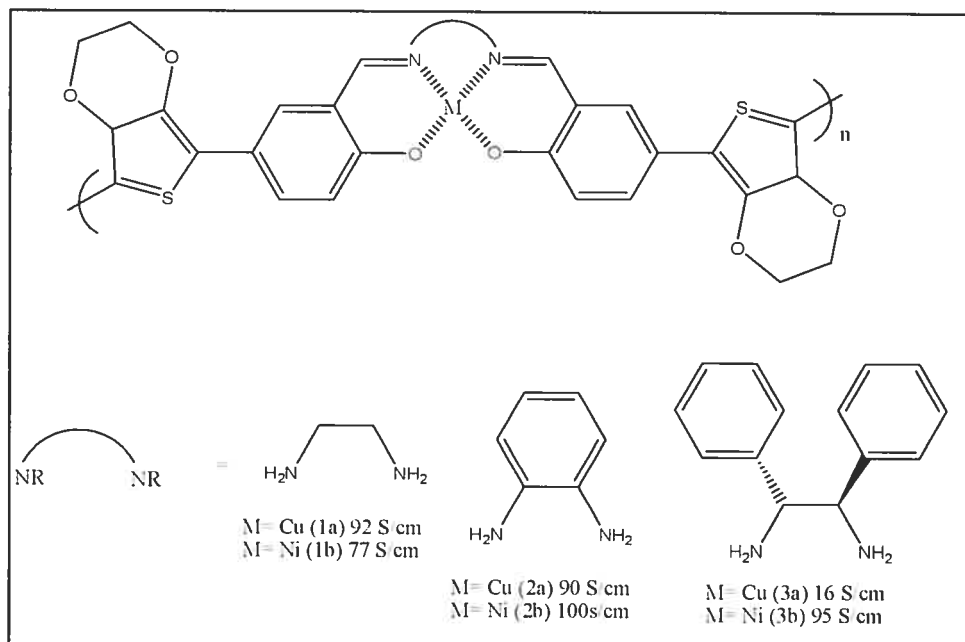
que ce type de polymère ne soit pas aussi conducteur qu'on l'espérait (environ  $10^{-3}$  S/cm). La structure rigide des polymétallosalens empêcherait le changement de conformation se produisant lors de la réaction d'oxydoréduction.<sup>9,10,38</sup> D'où la nécessité d'intercaler un second monomère entre les polymétallosalens afin de conférer une certaine souplesse structurale au polymère, propice au changement de conformation causé par la réaction d'oxydoréduction.



**Figure 23. Différents polysalens conducteurs**

#### 1.1.5.3.3 Polysalen-thiophène

Des polymétallosalen-thiophène ont été développés afin de résoudre le problème de rigidité structurale (**Figure 24, Page 30**).<sup>74</sup> De plus, l'équipe de recherche de Swager a étudié le mécanisme de conduction interchaîne en augmentant le volume du groupement attaché au salicylidène. Sachant que plus ce groupement est volumineux, plus l'espace interchaîne est grand, il a été possible d'évaluer l'importance de l'espace interchaîne sur la conductivité des polymères à base de cuivre et de nickel. De ces recherches, il résulte que la conductivité des polymères à base de cuivre diminue avec l'augmentation de l'espace interchaîne pour un maximum de conductivité de 92 S/cm (**Figure 24(1a), Page 30**).<sup>74</sup> Les complexes de nickel sont moins sensibles à l'augmentation de la séparation interchaîne et montrent une conductivité légèrement plus élevée (**Figure 24(2b) = 100 S/cm, Page 30**).<sup>74</sup>



**Figure 24. Polysalens-thiophènes conducteurs**

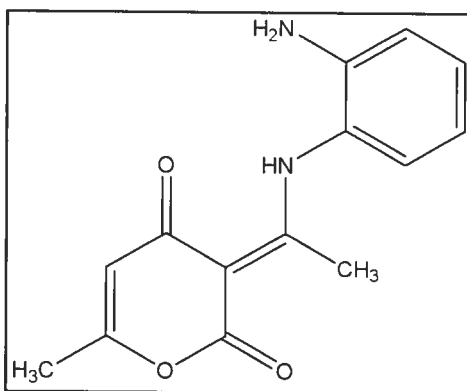
#### 1.1.5.4 Fabrication d'électrodes modifiées

##### 1.1.5.4.1 Poly-base de Schiff

Le développement d'électrodes modifiées est aussi une aire de recherche très active. Elle consiste à envelopper une électrode d'un mince film polymérique électroactif. La polymérisation électrochimique est une méthode de synthèse prometteuse puisqu'avec celle-ci, on obtient un grand contrôle sur l'épaisseur ainsi que sur l'homogénéité du film polymérique.<sup>75</sup> Beaucoup de ces polymères conducteurs sont développés pour la fabrication de piles rechargeables.<sup>76</sup> Agissant à titre d'électrode active sur les batteries, ces polymères conducteurs ont la capacité d'agir comme accepteurs et donneurs de charges électriques de façon réversible.

C'est dans ce but que plusieurs équipes de recherche travaillent sur la conception de nouveaux polymères conducteurs constitués de base de Schiff dont l'équipe de Yousef.<sup>77</sup>

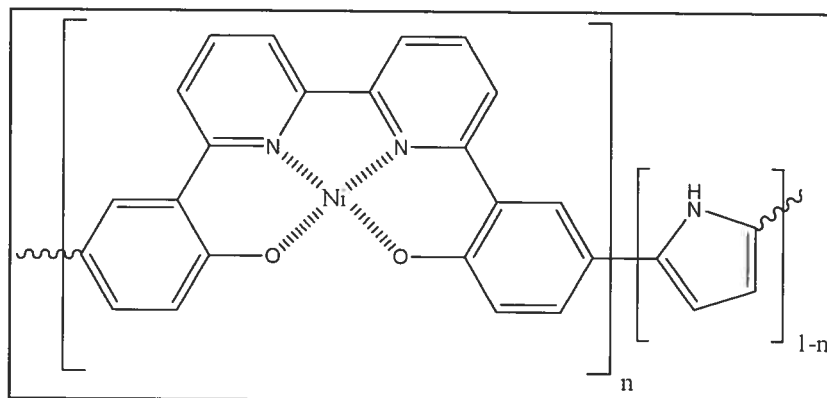
Cette équipe travaille sur la conception de films constitués de la base de Schiff 3-[1-(2-aminophénylénamino)-éthyl]-6-méthylpyran-2,4-dione (**Figure 25**). Les films sont obtenus par électro-oxydation sur une électrode de platine et agissent comme des systèmes redox réversibles en solution aqueuse.



**Figure 25.** Base de Schiff 3-[1-(2-aminophénylénamino)-éthyl]-6-méthylpyran-2,4-dione

#### 1.1.5.4.2 Polysalen-pyrrole

L'équipe de Maury travaille sur un copolymère composé de métallosalens et de pyrroles (**Figure 26, Page 32**).<sup>78</sup> Ce type de polymère peut servir de senseur puisque sa conductivité varie en fonction de l'état de l'espèce attractive.<sup>79</sup> La conductivité du poly(Ni-bpsalen) est  $10^3$  fois plus petite que la conductivité du polypyrrole à l'état oxydé. La structure et les propriétés du polypyrrole sont complètement modifiées par l'ajout d'unités de métallosalen électroactives. Cette équipe de recherche a réussi à obtenir de façon reproductible les caractéristiques des deux constituants en variant l'état d'oxydation de l'espèce métallique, ce qui fait de ce copolymère un outil prometteur en tant que senseur.



**Figure 26. Poly[(Ni-bpsalen)-pyrrole] conducteur**

### 1.1.6 Les métalloalènes : un outil pharmaceutique prometteur

Nous venons de voir que la structure, les substituants, la conformation et le choix du métal central influencent l'activité des métalloalènes quelle que soit l'application pour laquelle ils ont été développés. De nombreux autres facteurs doivent être considérés si l'on aspire à les employer comme outils pharmaceutiques. Entre autres, ils doivent être biodégradables et biocompatibles. C'est dans cette optique que sera abordée la prochaine section sur les biomatériaux.

## 1.2 Les biomatériaux

Selon la définition élaborée à Chester en 1986 à la Conférence de consensus organisée sous l'égide de la Société européenne des biomatériaux, les biomatériaux sont des matériaux non vivants, utilisés dans un appareil médical et destinés à interagir avec des systèmes biologiques. Ils ne se définissent pas par leur nature particulière mais par l'usage auquel on les destine. Ils regroupent aussi bien des matériaux issus du génie de l'homme (métaux, alliages métalliques, céramiques, matières plastiques) que des matériaux d'origine naturelle (collagène et cellulose), mais aussi des matériaux d'un nouveau type associant un des matériaux précités à une matrice biologique.

Les biomatériaux font l'objet de recherches actuelles et bénéficient de l'essor des biotechnologies pour aboutir à des systèmes capables d'interagir et de s'intégrer au milieu biologique. Les produits de telles recherches marquent la transition vers les matériaux hybrides et représentent certainement la nouvelle génération de biomatériaux et matériaux implantables qui permettra entre autres à la médecine du 21<sup>ème</sup> siècle de glisser du statut de médecine réparatrice à celui de médecine régénératrice.

### **1.2.1 La biocompatibilité, biointégration et biorésorption des biomatériaux**

La caractéristique commune aux biomatériaux est leur biocompatibilité, propriété dont le caractère multiparamétrique rend la fonction difficile à mesurer ou à évaluer objectivement. La biocompatibilité d'un biomatériau implique qu'il soit bien accepté par le milieu biologique d'accueil, voire bien intégré au sein de ce dernier, d'où le terme de biointégration couramment utilisé pour qualifier le résultat idéal que peu des biomatériaux synthétiques parviennent à obtenir. Cette intégration peut s'accompagner ou non d'une résorption de l'implant.

Le terme biorésorbable a été introduit pour qualifier les composés dont la dégradation et l'élimination par voie naturelle (métabolisation et élimination) ont été prouvées ; la biorésorption implique une élimination totale du matériau sans métabolite résiduel actif.

### **1.2.2 La biodégradation des polyesters**

Au cours des années, les polymères biostables, longtemps utilisés en médecine, ont été délaissés au profit de systèmes biodégradables beaucoup plus intéressants pour des applications thérapeutiques temporaires (en pharmacologie et en chirurgie). Les polymères



dégradables et biorésorbables sont maintenant utilisés en clinique sous diverses formes : sutures, pièces d'ostéosynthèse, systèmes pour la libération contrôlée de principes actifs.

C'est en 1970 qu'a débuté l'utilisation des polymères biodégradables synthétiques comme sutures.<sup>80</sup> Les sutures bioassimilables les plus largement répandues sont le Dexon (multifilament de polyglycolides (PGA)) et le Vicryl (un copolymère de PLGA contenant 8% d'acide lactique et 92% d'acide glycolique).<sup>81,82</sup> Des implants biodégradables sont également employés en ingénierie tissulaire pour la fixation d'os fracturés. De nos jours, plusieurs dispositifs orthopédiques sont disponibles commercialement tels que des agrafes de ligaturisation produites à partir de Lactomer (un copolymère de PLGA contenant 70% d'acide lactique et 30% d'acide glycolique).<sup>83-85</sup> Ces biomatériaux offrent le grand avantage de ne nécessiter aucune précaution particulière et, comme ils sont bioassimilables, aucune opération chirurgicale n'est nécessaire pour enlever l'implant après le traitement comparativement aux implants métalliques.

Au cours des deux dernières décennies, de nombreux efforts ont été consacrés au développement de dispositifs pharmacologiques à libération contrôlée de médicament.<sup>86-88</sup> La libération contrôlée d'ingrédients actifs à l'aide d'un vecteur biodégradable vise à améliorer l'efficacité thérapeutique et à augmenter le bien-être du patient. L'encapsulation d'un médicament dans une matrice polymérique permet de maintenir la concentration de médicament dans la marge désirée de l'index thérapeutique, ce qui augmente l'activité thérapeutique, diminue les effets secondaires et réduit le nombre d'administrations. Par ailleurs, de telles formulations peuvent être employées afin de livrer le médicament à l'emplacement approprié ainsi que pour protéger les composantes actives contre la dégradation environnementale et/ou enzymatique.

Une grande variété d'agents biologiquement actifs allant des stéroïdes de faible masse molaire à des polypeptides de haute masse molaires a été formulée dans cette perspective. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec du PLGA de masse molaire d'environ 25 000 Da constitué de 20-50% d'acide glycolique. Ces polymères peuvent

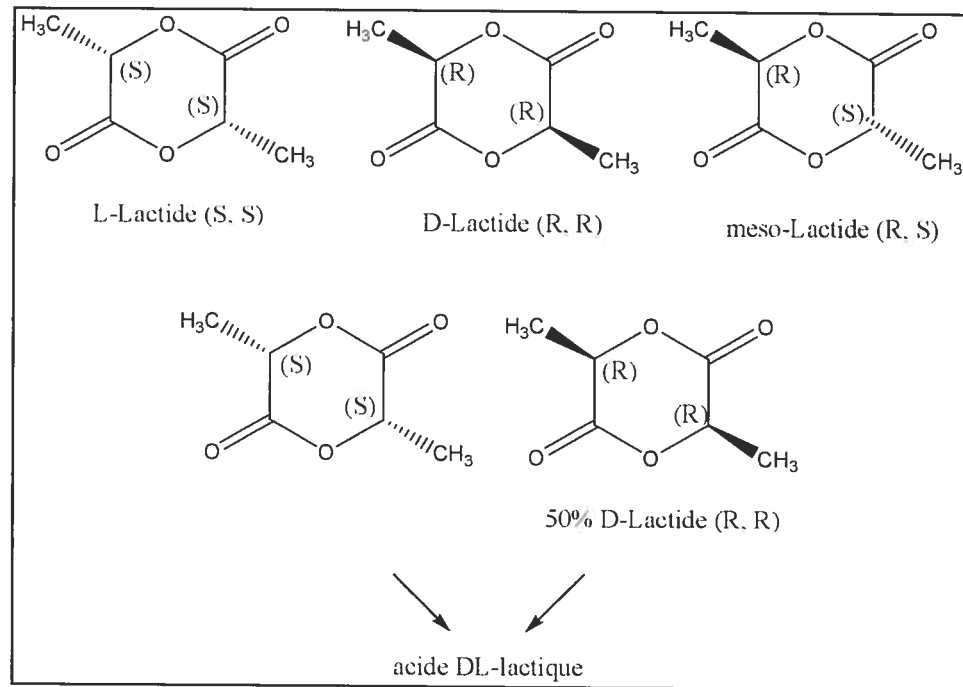
atteindre un chargement de médicament de 50% (en masse) et une vitesse de relargage d'environ 200 mg à 20 µg par jour. De toutes les formulations approuvées par la «Food and Drug Administration» (F.D.A). impliquant des polymères de PLGA, les plus importantes sont probablement le Lupron Depot (une formulation faite de PLGA et d'acétate de leuprolide, commercialisée par TAP Pharmaceutical Products Inc.) et le De-capeptyl (une formulation faite de PLA et de triptorelin pamoate, commercialisée par Ipsen Biotech). Ces deux formulations sont employées dans le traitement du cancer de la prostate et de l'endométriose. D'autres exemples bien connus sont le Nutropin Depot et la Sandostatine (deux formulations faites de PLGA et d'hormones de croissance humaines, commercialisées par Genentech et Novartis Pharma, respectivement). Bien que tous ces dispositifs soient administrés en implantation sous-cutanée en raison des propriétés biodégradables de la matrice polymère, ils n'ont pas besoin d'être enlevés. D'ailleurs, les avancées récentes dans la préparation de dispositifs à libération contrôlée de médicament sous forme de microparticules<sup>89</sup> et de nanoparticules,<sup>90,91</sup> laissent présager de nouveaux développements de formulation orale<sup>92,93</sup> aussi bien que nasale.<sup>94,95</sup>

#### 1.2.2.1 Le PLA

La biodégradation d'un polymère conduit à un changement de ses propriétés par modification de sa structure chimique via le clivage des liens entre chaque monomère du squelette.<sup>96</sup> La plupart des polymères biodégradables découverts ces vingt dernières années contiennent des liaisons hydrolysables (amide, ester, urée, uréthane). La présente recherche traite principalement de polyesters à base de polylactide (PLA) ; je me pencherai donc sur la dégradation spécifique du PLA.

Le lactide possède deux atomes de carbone chiraux conduisant à trois isomères différents (D, L ou DL). La configuration spatiale des lactides peut prendre 4 formes : L, D, méso et racémique (50 % L et 50 % D) (**Figure 27, Page 36**). Le L-PLA a une température

de fusion de  $175^{\circ}\text{C}$  et un  $T_g$  de  $65^{\circ}\text{C}$ . Le DL-PLA est un polymère amorphe; il possède une plus faible température de transition vitreuse ( $T_g$   $57^{\circ}\text{C}$ ).



**Figure 27. Formule du lactide**

Le groupement méthyle du PLA crée un effet stérique qui rend la molécule moins sensible à l'hydrolyse de la fonction ester que le 1,4-dioxane-2,5-dione bien que ce phénomène dépende du type de PLA, de la masse molaire, du degré de cristallinité, de la géométrie physique du spécimen et de l'environnement physicochimique du PLA. L'absence de cristallinité du DL-PLA rend sa dégradation plus rapide que celle du L-PLA. Par ailleurs, la F.D.A. a admis le PLA comme étant «généralement reconnu comme sûr».

Dans les tissus vivants, le PLA se dépolymérise totalement par l'hydrolyse chimique en acide lactique. La vitesse de l'hydrolyse dépend de la masse molaire, de la qualité de la surface de contact, de la composition et de la structure chimique du polymère ainsi que de son environnement. Lorsque le produit est au contact de tissus biologiques, il

se produit une hydratation, une dépolymérisation, une perte de masse molaire, une solubilisation/absorption ainsi que l'élimination de l'implant.

#### **1.2.2.2 L'hydratation**

La première étape de la biodégradation est l'hydratation du biomatériau. L'hydratation entraîne la rupture des forces de van der Waals et des liaisons hydrogène. Elle débute dès l'instant où le polyester est implanté dans le corps. La diffusion de l'eau dépend de la masse, de la surface, du milieu ainsi que de la structure chimique de l'implant. Elle peut donc durer quelques jours ou quelques mois. Par exemple, l'hydratation d'un segment amorphe du polymère est plus rapide que celui d'un segment cristallin.

Les polylactides de faible masse molaire étant de nature hydrophile, ils absorbent l'eau de même que leurs copolymères. L'eau pénètre rapidement la matrice polymérique tridimensionnelle, ce qui conduit éventuellement à une dégradation fragmentaire. Ce mécanisme est à l'opposé du mécanisme d'érosion de surface habituellement observé avec les matrices des polymères hydrophobes.

#### **1.2.2.3 La dépolymérisation**

La dépolymérisation est l'altération de la cohésion du biomatériau par clivage des liaisons covalentes. Cette deuxième étape est irréversible, mais sa vitesse est très variable. Elle dépend de la structure chimique, de la pureté, de la cristallinité et de la masse molaire initiale du polymère ainsi que du pH environnant, du volume et de la surface de l'implant.<sup>97-101</sup>

De plus, les polyesters sont de bons exemples démontrant le rôle du pH sur la dégradation puisque le produit de dégradation de l'acide polylactique est l'acide lactique qui est très soluble dans l'eau. Dû au groupement  $\alpha$ -hydroxy de l'acide lactique, le pKa (3.8) est moins élevé que pour les acides carboxyliques aliphatiques non-substitués (4.5).

Le faible pKa et le caractère hydrosoluble rendent l'acide lactique provenant de la dégradation susceptible d'abaisser le pH favorisant ainsi l'érosion interne du biomatériau. En d'autres mots, la diminution du pH engendrée par les acides carboxyliques présent sur la structure de l'acide lactique est la cause des effets d'autocatalyse qui conduisent à une érosion interne de l'implant plus rapide qu'à sa surface.<sup>96.102.103</sup>

À cette étape, on observe une diminution de la masse molaire et donc une diminution des propriétés mécaniques telle que la dureté. La masse totale du biomatériau ne diminue pas mais des fractures peuvent être observées à la surface.<sup>104</sup>

La dépolymérisation par hydrolyse enzymatique des polyesters a été étudiée. Ces études concluent que la voie majeure de dégradation s'effectue par une simple hydrolyse non-enzymatique.<sup>105</sup>

#### **1.2.2.4 La perte de masse**

La troisième étape du processus de dégradation, c'est la perte de masse. Elle se produit lorsque le biomatériau n'a plus de force de cohésion et commence à se fragmenter en particules de petite masse molaire.<sup>104</sup> À cette étape, on peut observer une réponse inflammatoire et quelquefois, des phagocytes et des cellules géantes.<sup>106</sup>

##### **1.2.2.4.1 L'érosion**

L'érosion désigne la perte de masse de la matrice polymérique due à la perte d'un monomère, d'un oligomère ou de tout autre fragment non-dégradable du polymère.<sup>103</sup> Les trois premières étapes de la dégradation sont régies par l'érosion du polymère. Durant l'érosion, il y a compétition entre la diffusion de l'eau et la dégradation du polymère. Par exemple, si la dégradation se fait rapidement, la diffusion de l'eau à l'intérieur du biomatériau est gênée.<sup>107</sup> L'érosion est donc confinée à la surface. Par contre, si la

dégradation est plus lente que la diffusion de l'eau, la dégradation complète du polymère par érosion se produit puisque l'eau peut pénétrer jusqu'au cœur du polymère.

La dégradation d'un biomatériau constitué de PLA est plus rapide à l'intérieur qu'en surface, phénomène appelé dégradation hétérogène. Ainsi, pour un même polymère, les objets massifs se dégradent paradoxalement plus vite que des objets plus petits tels que des microparticules. Ce mécanisme combine phénomènes de diffusion et réactions chimiques. Si l'on prend comme exemple la dégradation du poly(DL-lactide), polymère initialement homogène, une fois qu'il est placé dans un milieu aqueux et que l'eau commence à pénétrer dans la masse, des liaisons ester sont clivées par hydrolyse, conduisant à la formation d'extrémités acide carboxylique responsables de la réaction d'hydrolyse par autocatalyse. Pour des échantillons de dimensions relativement importantes (supérieures au mm), deux facteurs contribuent à atténuer, ou même à supprimer, l'effet autocatalytique au niveau de la surface. D'une part, les extrémités acide carboxylique peuvent être neutralisées par le milieu tamponné environnant, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. D'autre part, les produits de dégradation (monomère, dimère, trimère, etc.) formés à la surface peuvent facilement diffuser et se solubiliser dans ce même milieu. On remarque que l'autocatalyse s'exprime intégralement au cœur d'un biomatériau aux proportions importantes, ce qui se traduit par une différenciation surface/intérieur de l'objet. Cette différenciation s'amplifie au fur et à mesure de la dégradation et, à la fin, les macromolécules de l'intérieur sont toutes réduites à des oligomères solubles qui migrent à travers la couche superficielle pour ne laisser qu'une coquille vide. Cette dernière continue alors à se dégrader à faible vitesse.

L'érosion change la composition du polymère et, par conséquent, ses propriétés physicochimiques. La masse molaire diminue lors de ce processus mais ceci prend un certain temps puisque, pour être soluble dans l'eau, le PLA ne doit contenir que quelques unités de monomère.<sup>108, 109</sup>

### 1.2.2.5 La solubilisation/absorption

La quatrième étape de dégradation est l'absorption. Ceci survient lorsque l'hydrolyse produit des fragments de taille susceptibles d'être assimilés par des phagocytes ou lorsque les produits de l'hydrolyse conduisent à des monomères de lactate solubles à l'intérieur du fluide intercellulaire. C'est durant cette étape que le biomatériau subit une diminution de masse qui correspond à un processus d'absorption physique.

Les enzymes extracellulaires sont connues pour avoir un rôle dans la dégradation *in vivo* à l'extérieur des cellules. Ceci suggère deux possibilités de dégradation. D'abord, la dégradation extracellulaire s'effectue par une combinaison d'hydrolyse simple et, ensuite, à l'aide de médiateurs enzymatiques. Les fragments ainsi générés sont phagocytés et une fois à l'intérieur des cellules, ces fragments sont dégradés par hydrolyse.<sup>110</sup>

### 1.2.2.6 L'élimination.

L'étape de l'élimination convertit le lactate en  $\text{CO}_2$  et pyruvate. Le pyruvate entre dans le cycle de Krebs par l'acétylation du coenzyme A. La majorité de l'élimination des produits de dégradation du PLA se produit lors de la respiration ( $\text{CO}_2$ ) et seulement une minorité par l'urine.<sup>111</sup>

## 1.3 Présentation du projet de recherche

### 1.3.1 L'originalité du projet de recherche

Compte tenu des propriétés redox du centre métallique cationique, grandement exploitées en catalyse chimique et biologique et qui favorisent la conductivité des métalloalènes telle qu'énumérées précédemment, nous nous proposons de synthétiser une nouvelle classe de polyesters organométalliques à base de métalloalènes et à vérifier son

applicabilité au domaine de la régénération tissulaire et de la thérapie génique. L'originalité du projet repose sur le fait qu'aucun polyester de salen n'a été synthétisé à ce jour.

### **1.3.2 Les biomatériaux à base de salen au service de la régénération tissulaire**

L'inéluctable outrage du temps sur le corps humain ainsi que les nombreuses maladies liées au passage des années justifient des besoins croissants d'organes de remplacement. Les réussites remarquables obtenues par les transplantations classiques (réussites techniques associées à la multiplication des médicaments antirejet et à la maîtrise de leur administration) sont aussi accompagnées de différents inconvénients parmi lesquels la pénurie du nombre de greffons : la liste des demandeurs s'allonge, l'opposition due aux considérations d'ordre culturel progresse et le nombre de transplantations d'organes plafonne. De plus, il s'est avéré au cours des dernières années que les transplantations d'organes présentaient un risque significatif de transmission d'agents pathogènes. Enfin, l'inconvénient majeur réside dans l'obligation de suivre un traitement immunosuppresseur à vie même si certains patients développent à terme une tolérance au greffon. Scientifiques et médecins ont depuis longtemps cherché des solutions alternatives à la transplantation d'organes humains. D'où l'émergence de la régénération tissulaire.

La reconstruction tant des tissus que des organes humains semble être une avenue prometteuse mais nécessite le développement de nouveaux biomatériaux implantables.<sup>112</sup> Ces biomatériaux serviront de dispositifs d'assistance corporelle capables de suppléer les fonctions des organes lésés. Trois stratégies thérapeutiques différentes peuvent être adoptées pour régénérer des tissus perdus, blessés ou malades : la thérapie cellulaire, le génie tissulaire et les structures de guidage.



### 1.3.2.1 La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire permet d'implanter des cellules dans le corps humain sous forme encapsulée ou non, ou dans un site isolé du système immunitaire. Cette technique permet habituellement de corriger un déficit sécrétoire, hormonal ou autre. Par exemple, on étudie la possibilité de traiter l'ostéoporose à l'aide de la thérapie cellulaire.

Lors du remodelage des tissus osseux, un processus combiné de dissolution (résorption) et de formation ont lieu. Ces processus fonctionnent à l'aide de deux types de cellules, soit les ostéoclastes, qui détruisent l'os, et les ostéoblastes, qui le reconstruisent. Dans des os normaux, le fonctionnement des deux types de cellules est rigoureusement coordonné de façon à maintenir la masse osseuse à l'intérieur de limites définies. La perte de la masse osseuse peut être associée à différentes pathologies métaboliques. L'ostéoporose, par exemple, se produit lorsque le processus de résorption excède celui de formation, ce qui entraîne une fragilisation progressive des os. Il semble que le cycle de restructuration s'amorce au niveau des micro-fractures de la matrice osseuse. Les ostéoclastes sont sollicités en premier pour résorber l'os endommagé, puis les ostéoblastes interviennent pour «obturer» l'espace résorbé. Plusieurs groupes de recherche tentent d'implanter des cellules ostéoblastes pour le traitement de l'ostéoporose et ainsi augmenter la capacité de l'os à se reformer de lui-même.<sup>113-115</sup>

### 1.3.2.2 Le génie tissulaire

Le génie tissulaire est un nouveau domaine biomédical qui permet de reconstruire des structures proches des tissus à partir de cellules vivantes conduisant à une intégration immédiate et interactive de ces tissus dans le corps humain. La méthode de plus en plus employée actuellement est celle de la croissance *in vitro* de cellules sur une structure d'échafaudage biodégradable.<sup>112,116</sup> Elle comporte deux étapes principales. Premièrement, cette structure estensemencée avec des cellules et des facteurs de croissance.

Deuxièmement, elle est placée dans un milieu de culture,ensemencé ou non, pendant une période de culture à l'intérieur d'un bioréacteur à perfusion. Par la suite, le tissu résultant peut être implanté.

### 1.3.2.3 Les structures de guidage

L'approche des structures de guidage a pour objectif de baliser, en quelque sorte, le potentiel régénératif de l'organisme grâce à l'utilisation de structures tridimensionnelles menant à des tissus ou des organes actifs. Ces échafaudages doivent fournir une structure tridimensionnelle pour supporter la croissance de nouveaux tissus aux propriétés semblables au tissu de remplacement.<sup>116</sup> Ainsi, un « moule » du tissu à reconstruire est créé avec les matériaux adéquats, lesquels peuvent éventuellement être enrichis avec des molécules stimulant la croissance cellulaire. Ces biomatériaux se doivent d'être biocompatibles et biodégradables, leur rôle étant de favoriser la pénétration des cellules de façon ordonnée.<sup>117</sup> De tels biomatériaux sont donc implantés dans le corps humain sans qu'ils contiennent au préalable des cellules. C'est cette dernière approche que nous proposons d'utiliser afin de créer un biomatériau capable de régénérer les tissus nerveux.

### 1.3.2.4 La régénération nerveuse

Le neurone est une cellule nerveuse dérivée d'une cellule embryonnaire appelée neuroblaste. Notre capital de neurones étant fixé dès la naissance, aucune autre division de cellule souche ne pourra donner de nouveaux neurones. C'est donc dire que toute destruction de neurones après la naissance est définitive.

La morphologie des neurones se compose du corps cellulaire et de ses expansions (**Figure 28, Page 45**). Le corps cellulaire ou périkaryone entoure le noyau. Sa membrane est formée de deux couches de molécules phospholipides présentant des orifices ou canaux, permettant les échanges ioniques de sodium ( $\text{Na}^+$ ), de potassium ( $\text{K}^+$ ) et de chlore ( $\text{Cl}^-$ ) avec l'extérieur de la cellule.<sup>118</sup> Le cytoplasme contient des mitochondries, petits organes

intracellulaires qui fournissent l'énergie nécessaire au métabolisme cellulaire et des inclusions sécrétoires appelées corps de Nissl. Le cytoplasme contient aussi de la mélanine sous forme de pigments jaunâtres et noirs. Il existe enfin des inclusions spécifiques que l'on nomme les neurofibrilles.

On distingue deux types d'expansions qui partent du corps cellulaire. Ce sont les dendrites (prolongements protoplasmiques ramifiés) et l'axone (prolongement unique qui possède des branches collatérales et se termine par une arborisation de fibres).

L'axone prend le nom de cylindraxe ou fibre nerveuse lorsqu'il est recouvert de ses gaines. Il existe deux sortes de gaines isolée ou associée entourant la fibre nerveuse : la gaine de myéline et la gaine Schwann ou neurilème (**Figure 28, Page 45**). La myéline est un mélange de lipides phosphorés. Elle donne à la fibre nerveuse une couleur blanche mate caractéristique. Elle est considérée comme une réserve nutritive pour le cylindraxe et elle joue le rôle d'un isolant électrique.<sup>118</sup> C'est-à-dire qu'elle protège la fibre nerveuse des courants d'influx venant des fibres voisines. La gaine de myéline présente pour sa part des incisures (incisures de Schmidt-Lantermann) et des étranglements appelés noeuds de Ranvier. La gaine de Schwann recouvre la gaine de myéline. Elle est formée de cellules plates soudées entre elles.

L'ensemble du système nerveux central est constitué de multiples chaînes de neurones. La fibre nerveuse a pour fonction de conduire l'influx nerveux d'un neurone à l'autre. Le sens de la propagation de l'influx nerveux se fait toujours du dendrite vers l'axone. L'influx nerveux résulte d'une variation transitoire, de l'ordre d'une milliseconde, de la répartition des ions situés de part et d'autre de la membrane cellulaire. La transmission de l'influx nerveux dans la synapse (connexions entre les neurones) se fait grâce à la libération locale de substance chimique (adrénaline, acétylcholine, dopamine etc...).<sup>118</sup> Ces substances sont appelées médiateurs chimiques ou neuro-transmetteurs.

Dans le cas d'un neurone sensitif, l'influx nerveux prend naissance au niveau d'un récepteur périphérique et se propage le long de la fibre nerveuse jusqu'à son arborisation terminale. La naissance de l'influx nerveux est donc la conséquence de phénomènes physico-chimiques qui ont lieu au niveau du récepteur. Tandis que, dans le cas d'un neurone moteur, l'influx nerveux prend naissance à la jonction du corps cellulaire et de l'axone. Il est la conséquence de phénomènes physico-chimiques se produisant au niveau du corps cellulaire à la suite d'une stimulation du neurone moteur par un autre neurone.

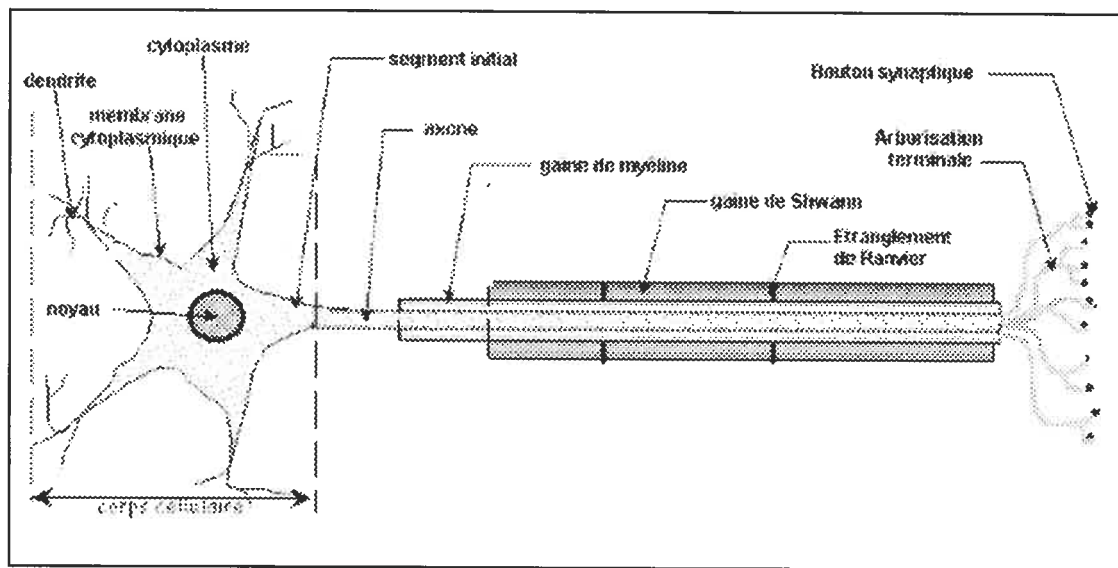


Figure 28. Le neurone (<http://student-medical.ibelgique.com/alzheimerfr.html>)

### 1.3.2.5 La problématique

Si la fibre nerveuse est interrompue avec conservation de ses gaines de Schwann et de myéline, la régénération se fait normalement à la vitesse approximative d'un millimètre par jour, et la fibre retrouvera son trajet normal en suivant les gaines. Si les gaines sont interrompues, la fibre nerveuse peut repousser dans des gaines de voisinage et présenter éventuellement des fausses routes. Par contre, si les gaines sont interrompues et les deux segments très écartés, les fibres n'étant plus guidées se recourbent en pelotons ou en boules appelés névromes, qui sont spécialement douloureux. Que ce soit accidentel, causé par une

maladie ou le vieillissement, une question demeure : Quoi faire dans ces cas particulier où la régénération nerveuse n'est pas spontanée? L'émergence des biomatériaux et des biotechnologies offre de nouvelles stratégies de recherche et l'espoir de résoudre un jour ce problème.

#### **1.3.2.6 Les objectifs généraux:**

À l'évidence, le résultat observable est conditionné par l'évolution de la réaction inflammatoire aiguë consécutive à l'implantation et par le comportement des cellules des tissus péri-implantaires. Selon la nature du matériau, la structure de sa surface, ses caractéristiques physico-chimiques superficielles et la micromorphologie, ces cellules vont être capables d'adhérer au matériau, de s'étaler, de migrer, de proliférer, de synthétiser et de sécréter les composants d'une nouvelle matrice extracellulaire et de contribuer ainsi à l'édification d'un néotissu au sein duquel l'implant est parfaitement intégré.

Pour la régénération de tissu mou tel que les tissus nerveux et les cartilages, il n'est pas nécessaire d'utiliser un implant permanent. De ce fait, les matériaux utilisés pour fabriquer ces échafaudages doivent présenter des propriétés biologiques et mécaniques adéquates afin d'être biodégradables et biorésorbables. Un grand nombre de matériaux biorésorbables ont été étudiés comme échafaudages pour la régénération tissulaire tel que les polymères naturels<sup>116</sup> et synthétiques<sup>119,120</sup>, aussi bien que la céramique, les verres<sup>121</sup> et les composés bioactifs poreux polymère/céramiques.<sup>122</sup>




Depuis les dix dernières années, les polymères biorésorbables synthétiques sont de plus en plus employés, en particulier le polylactide, le polyglycolide (PGA) et leurs copolymères.<sup>119,120</sup> Choisir des matériaux synthétiques est avantageux puisque leur micro et leur macrostructure peuvent être pensées avec précision afin d'obtenir les conditions optimales pour la survie des cellules, leur prolifération, et la formation ultérieure de tissu.<sup>119</sup>

Pour la régénération des tissus mous contenant une structure tridimensionnelle, il faut développer des échafaudages avec une conformation tubulaire afin de stimuler la croissance tridimensionnelle du tissu. La porosité des murs du tube est un autre paramètre principal afin de favoriser l'infiltration de cellules aussi bien que la diffusion des liquides et des nutriments jusqu'aux tissus entourant l'implant.

Les recherches menées par notre laboratoire se concentrent sur la régénération des tissus nerveux. L'objectif général est de développer une structure de guidage capable de servir de dispositif d'assistance corporelle. Par conséquent, le biomatériau doit posséder les mêmes fonctions que le tissu nerveux, soit de permettre le passage de l'influx nerveux d'un neurone à l'autre. Afin de remplir ce rôle, l'implant biodégradable et biocompatible doit posséder certaines caractéristiques structurales. Un tel implant, développé en vue de servir de substitut biologique, devrait être capable de maintenir, restaurer et améliorer la fonction des tissus nerveux.

### 1.3.2.7 Les hypothèses et objectifs spécifiques

Nous proposons de faire la synthèse de copolymères linéaires alternés et de copolymères réticulés à base de métallosalens afin de servir en tant que support de régénération tissulaire (**Figure 29**).

-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-	Homopolymère		Polymère linéaire
-A-B-B-A-B-A-A-B-A-B-	Copolymère aléatoire		Polymère branché
-A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-	Copolymère alterné		Polymère réticulé
-A-A-A-A-A-B-B-B-B-B-	Copolymère en bloc		
-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-   B-B-B-B-B-B-B-B-	Copolymère greffé		

**Figure 29. Représentation de polymères**

Plusieurs objectifs spécifiques découlent de ce projet de recherche. La structure des polyesters de salen doit être conçue afin de répondre à des conditions précises. C'est-à-dire que la fabrication de tels biomatériaux nécessite une structure biodégradable, biocompatible et conductrice (objectifs spécifiques). Pour remplir ces conditions tout en tenant compte des informations données précédemment, nous avons posé les hypothèses suivantes :

- a. Les liaisons ester des polymères assurent la dégradation du produit.
- b. Les métallosalens ainsi que le PLA sont biocompatibles.
- c. Les métallosalens, la chaîne aliphatique et téréphtalique permettent la conductivité.

C'est donc en ce sens, qu'au chapitre deux, je développe la synthèse de polyesters de salen conducteurs répondant à ces objectifs. J'y présente la synthèse de polyesters de salen *co*-alcanes et *co*-téréphtaliques ainsi que des structures réticulées à base de PLA. De plus, la caractérisation physicochimique complète y est effectuée à l'aide de : la RMN-<sup>1</sup>H (spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton), la RMN-<sup>13</sup>C (spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du carbone), l'IR (infrarouge), l'analyse élémentaire, la spectrométrie de masse, la DSC (differential scanning calorimetry), la TGA (analyse thermogravimétrique), le point de fusion, le microscope polarisant, l'AFM (microscope à force atomique), l'angle de contact et l'AA (absorption atomique). Enfin, la cytotoxicité de ces polyesters de salen est étudiée ainsi que leur caractère conducteur.

### 1.3.3 Les biomatériaux à base de salen au service de la thérapie génique

La thérapie génique repose sur le transfert d'un gène thérapeutique. En effet, elle utilise l'ADN codant comme un médicament qui, une fois parvenu dans le noyau cellulaire, permet la synthèse continue ou contrôlée de l'agent thérapeutique effectif; celui-ci peut être soit le transcrit ARN, soit la protéine traduite à partir de cet ARN. Elle fut au départ

considérée pour traiter les maladies génétiques induites par la déficience d'un seul gène que l'on nomme monogénique. Ces maladies regroupent un vaste ensemble de pathologies qui peuvent être soit bénignes (le daltonisme), soit graves et souvent léthales (fibrose kystique).

Pour qu'une maladie se prête à la thérapie génique, il faut une certaine connaissance de celle-ci (gène connu), que la mutation s'effectue sur un faible nombre de gènes et qu'il n'y ait pas d'autre thérapeutique efficace. Pour ces maladies génétiques, une thérapie protéique basée sur l'administration de protéines naturelles ou recombinantes (par exemple un facteur de coagulation) ou une thérapie cellulaire basée sur l'administration de cellules (transfusion de globules rouges pour le traitement de l'anémie falciforme) ne sont employables que dans une minorité des cas. En effet, pour la plupart des maladies monogéniques, on ne peut pas fournir la protéine thérapeutique de remplacement, et ceci pour plusieurs raisons : l'instabilité et la difficulté à produire cette protéine ou tout simplement parce que la protéine déficiente est intracellulaire, et qu'il n'est actuellement pas possible d'administrer la protéine à l'intérieur des cellules.

Ce dernier point illustre l'incontournable avantage du transfert de gène thérapeutique : si l'on fournit à un tissu une copie normale d'un gène défectif, on contourne le problème de l'administration intracellulaire de protéines complexes puisque le produit protéique du transgène est synthétisé dans la cellule par le biais de machinerie biosynthétique.

De plus, même lorsqu'une protéine exogène peut être utilisée, la thérapie génique présente plusieurs avantages par rapport à l'injection de protéines recombinantes ou purifiées à partir de donneurs :

- d'une part, la thérapie génique présente un avantage pharmacocinétique indéniable, puisque l'on peut exprimer la protéine de manière continue, permettant ainsi une couverture thérapeutique constante, dénuée du pic de concentration plasmatique observé au moment de l'injection d'une protéine.



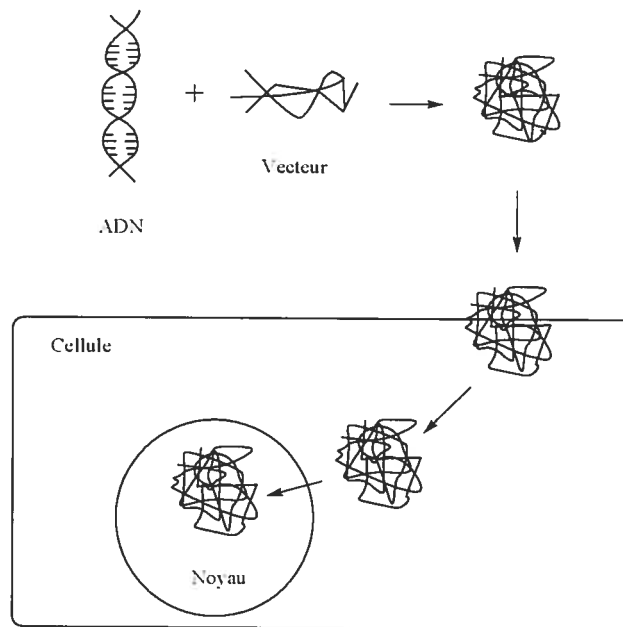
- enfin, l'administration unique ou rare est beaucoup mieux tolérée par le malade qu'une administration quotidienne, voir pluriquotidienne.

Le cancer<sup>123</sup> représente, avec les maladies virales<sup>124</sup> et la régénération tissulaire<sup>125</sup>, un domaine où les avantages du transfert de gène intracellulaire s'exprime de façon remarquable. C'est sur ce dernier point que nous nous penchons dans le cadre de ce projet de recherche.

#### 1.3.3.1 Les vecteurs :

L'ADN non-protégé est dégradé rapidement par les nucléases présentes dans le plasma et ne rentre pas spontanément dans les cellules. Un grand nombre d'obstacles doivent donc être surmontés pour transporter un gène puisque celui-ci doit se rendre à une cellule précise, il doit être capable de pénétrer la membrane cellulaire, de survivre à la dégradation de l'endosome intracellulaire et puis, finalement, de localiser le noyau de la cellule. L'outil idéal pour le transport et la protection de l'ADN est l'utilisation d'un vecteur (**Figure 30, Page 51**) que l'on peut classer en deux catégories:

- les vecteurs viraux ou la cassette d'expression thérapeutique est intégrée dans le génome d'un virus recombinant.
- les méthodes non-virales, qui regroupent les vecteurs chimiques d'ADN et les techniques physiques d'administration d'ADN.



**Figure 30. La thérapie génique**

#### 1.3.3.1.1 Les vecteurs viraux

Il est tout naturel de songer aux virus pour transférer du matériel génétique. Un virus est en effet un vecteur pour son propre génome, qu'il introduit et fait reproduire par les cellules infectées. Les virus ont donc, au cours de l'évolution, développé des stratégies extrêmement performantes pour transporter leur génome au noyau des cellules. De nombreux vecteurs viraux ont été employés à ce jour : les rétrovirus, l'adénovirus et le virus associé à l'adénovirus.<sup>126</sup>

Malgré l'efficacité de transport démontré par le système viral comparativement au système non-viral, il possède plusieurs inconvénients majeurs.<sup>127</sup> Sa faible capacité à emménager de grandes quantités d'informations génétiques, les risques de toxicité, et de réponses immunitaires limitent la possibilité d'administration *in vivo*.<sup>128</sup>

### 1.3.3.1.2 Les vecteurs non-viraux

L'ADN thérapeutique non viral utilise des plasmides bactériens comme vecteurs d'expression génétique, et des agents chimiques ou des méthodes physiques comme vecteurs d'administration de ces plasmides.<sup>129-131</sup> Les techniques non-virales présentent l'avantage de ne pas générer de réponse immune contre le vecteur, ce qui permet une réadministration.<sup>129-131</sup> De plus, il n'y a pas de risque de recombinaison conduisant à des agents réplicatifs.<sup>129-131</sup> Enfin, il n'y a pas de limite théorique à la taille de l'ADN transfecté. Cependant, malgré une efficacité *in vitro* égale et même supérieure à certains vecteurs viraux, les méthodes non-virales restent actuellement moins efficaces *in vivo*.<sup>132,133</sup>

Les vecteurs chimiques d'ADN sont des molécules cationiques s'auto-associant avec l'ADN, qui est un polymère polyanionique à cause des charges portées par les groupements phosphates. Les vecteurs chimiques d'ADN les plus utilisés sont soit des polymères cationiques, soit des lipides cationiques. Polymères<sup>134-137</sup> et lipides<sup>138,139</sup> cationiques forment avec l'ADN polyanionique des complexes appelés respectivement polyplexe et lipoplexe.

Bien que plusieurs types de polymères cationiques<sup>134-137</sup> aient été explorés, des polymères basés sur la poly(L-lysine) (PLL)<sup>140-143</sup>, le poly(éthylèneimine) (PEI)<sup>144-147</sup>, le poly(amidoamine) (PAMAM)<sup>143,148,149</sup>, le chitosane<sup>150,151</sup> et le polylactique-co-glycolique<sup>143</sup> sont parmi les plus utilisés.

Dans le cas d'une injection intraveineuse *in vivo*, on a constaté que l'efficacité de la liaison entre le plasmide et le polymère condense le plasmide/DNA et permet une protection contre l'acide nucléique durant le transport intracellulaire.<sup>152,153</sup> De plus, l'ADN compacté est protégé des forces mécaniques ou biologiques telles que l'action des DNases extracellulaires (les DNases sont des enzymes-protéines qui coupent l'ADN).<sup>154</sup> Par contre, les polyplexes ou les lipoplexes d'ADN compactés peuvent être éliminés de la circulation

par le système réticulo-endothélial.<sup>154</sup> De plus, les lipoplexes et les polyplexes forment des interactions non spécifiques avec les constituants du sang, en particulier l'albumine, qui conduisent à l'inactivation de leur capacité de transfert de gène.<sup>154</sup> On peut partiellement circonscrire ces problèmes en adjoignant aux polyplexes et lipoplexes une couche externe formée de chaînes de PEG (polyéthylèneglycol).<sup>155</sup> Dans le cas des lipoplexes, ces chaînes de PEG sont ancrées dans la particule par la partie lipidique hydrophobe. Ces chaînes de PEG jouent le rôle de stabilisateur colloïdal qui prévient la précipitation des lipoplexes. Enfin, il est possible de greffer chimiquement sur les vecteurs eux-mêmes, ou à l'extrémité des chaînes de PEG, des molécules assurant le ciblage vers les récepteurs cellulaires appropriés. Par exemple, l'ajout de ligands qui se lient à un récepteur spécifique de la surface cellulaire augmente la concentration des complexes d'ADN à la surface des cellules et permet d'augmenter l'internalisation cellulaire.<sup>156-159</sup>

Les quantités respectives d'ADN et de vecteur cationique ainsi que la nature du solvant, le mode opératoire ou encore le rapport de charge lipoplexes ou polyplexes/ADN (+/-) influent sur la structure des particules obtenues et sur l'efficacité de transfection.<sup>145,160</sup> La structure finale du complexe dépend du rapport des charges cationiques apportées par le vecteur sur les charges anioniques de l'ADN. Si ce rapport est égal ou inférieur à 1, il y a agrégation. Par contre, si ce rapport est supérieur à 1, de petites particules globalement cationiques sont formées. Leur taille réduite est très importante puisqu'elle assure la biodisponibilité et l'accessibilité au tissu ciblé.<sup>145,160</sup>

Le mécanisme d'internalisation cellulaire de l'ADN repose sur l'interaction électrostatique entre la membrane cellulaire anionique et les lipoplexes ou polyplexes, qui sont globalement rendus cationiques par l'excès de charges apportées par le vecteur. L'internalisation se fait par endocytose.

### 1.3.3.2 La problématique

Comme nous venons de le voir, la thérapie génique se propose de remplacer le gène défectueux ou manquant en introduisant, à l'intérieur de la cellule, le gène sain conduisant au fonctionnement normal de la cellule. La thérapie génique est donc l'introduction d'ADN codant pour une protéine à l'intérieur d'une cellule spécifique. Malheureusement, plusieurs obstacles doivent être surmontés pour transporter un gène à sa cible. L'utilisation de vecteur polymérique pourrait être un outil efficace à la transfection.

### 1.3.3.3 Les objectifs généraux

Récemment, des échafaudages polymériques complexés à l'ADN ont été fabriqués à partir d'une variété de matériaux synthétiques (polylactide-co-glycolide) afin de supporter l'adhésion cellulaire et la migration de l'ADN.<sup>161</sup> Ces échafaudages augmentent la concentration locale de l'ADN dans le micro-environnement cellulaire.<sup>162-164</sup> Le transfert de gène inhérent à ces échafaudages polymériques donne de bons résultats grâce à l'augmentation de la concentration de l'ADN à la surface cellulaire.<sup>165</sup> Ce qui nous laisse penser qu'une structure polymérique composée de PLA et de métallosalen favoriserait tout autant le transport de gène.

Nos recherches se poursuivent donc en ce sens, en développant la synthèse de copolymères cationiques greffés (**Figure 29, page 47**) à base de métallosalens et de PLA. Ces nouveaux biomatériaux sont considérés pour servir de vecteur en thérapie génique. La complexation des fonctions cationiques du métallosalens avec les fonctions négatives de l'ADN, condense celui-ci et produit un complexe avec une charge extérieure moins négative (sinon positive) ce qui permet d'augmenter l'internalisation cellulaire de l'ADN et de protéger l'ADN contre une dégradation prématurée. Le tout, bien sûr, en respectant les critères de biodégradation et de biocompatibilité essentiels aux biomatériaux.

#### 1.3.3.4 Hypothèses et objectifs spécifiques

La présente recherche traite donc de la synthèse de copolymères branchés à base de métallosalens et de PLA pour la thérapie génique. La fabrication de tels biomatériaux nécessite une structure biodégradable, biocompatible et capable de se complexer à l'ADN (objectifs spécifiques). Les hypothèses qui ont été posées sont les suivantes :

- a. Les liaisons ester assurent la dégradation du produit.
- b. Les métallosalens, le PLA ainsi que le PGLY assurent la biocompatibilité.
- c. Les métallosalens permettent la complexation à ADN.

C'est aux chapitres trois et quatre que sont décrit la synthèse de polyesters de salen greffés à une structure polymérique de PLA pour la thérapie génique ainsi que la synthèse de PGLY (polyglycine) répondant à ces objectifs. La caractérisation physicochimique complète de ces polymères y est effectuée à l'aide de : la RMN- $^1\text{H}$ , la RMN- $^{13}\text{C}$ , l'IR, l'analyse élémentaire, le DSC, le TGA, le microscope polarisant, l'AA et l'AFM. Le caractère dégradable, la cytotoxicité ainsi que la complexation de ces polymères à l'ADN seront également étudiés.

## **Chapitre 2. Copolymères linéaires en régénération tissulaire**

*«La Science ? Je suis celui qui ne sait rien, qui devine  
parfois, qui trouve souvent, qui s'étonne toujours.»*

**Edison, L'Eve future, 1886**

## **2.1 Article 1: Synthesis and characterization of biodegradable and charged salen-based polymers**

Véronique Nadeau<sup>1</sup>, Jean-Michel Rabanel<sup>1</sup>, Shilpa Sant<sup>1</sup>, Roula Chahwan<sup>1</sup>, Sophie-Dorothée Clas<sup>2</sup> and Patrice Hildgen<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de nanotechnologie pharmaceutique, Faculté de pharmacie, Université de Montréal, CP 6128, succursale Centre Ville, Montréal, (Québec) H3C 3J7 Canada.

<sup>2</sup> Merck Frosst Canada & Co., Kirkland (Québec) Canada.

\*Corresponding author; TEL: (514)-343-6448.

### **ABSTRACT**

The goal of this study was to synthesize novel biodegradable charged polymers for medical applications. The polymers synthesized were metal coordinated salicylidene-based copolymers. The linear copolymers were prepared by polycondensation of the metal coordinated salicylidene monomer with acyl or aryl dichloride. Structure analysis was carried out by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR, FT-IR and elemental analysis. Physico-chemical evaluation was carried out using DSC and thermogravimetry. The surface properties were analyzed by contact angle measurements and the crystallinity was determined by polarizing microscopy and AFM. Finally, polymer electrical conductivity and biocompatibility were examined.

**KeyWords;** Conducting Polymer, Biocompatibility, Synthesis, Biodegradable, metal-coordinated salicylidene-based copolymers



### 2.1.1 Introduction

About 40 years ago, it seemed a paradox that such well-known insulators as organic compounds could become electrically conductive. In the 1960s, it was pointed out that complex formation between electron acceptors and electron donors increases the conductivity by several orders of magnitude. During this period, conductive polymers with conjugated double bonds were also being developed, including polymers such as polypyrroles and polythiophenes.<sup>1</sup> More recently, conductive metallopolymer have been developed.<sup>2</sup> Within this group, the salicylidene-based copolymers are of special interest, due to their various applications; namely, as catalysts<sup>3-6</sup> or free radical scavengers<sup>7-9</sup> and as material to make electrodes.<sup>10,11</sup> Their non-linear optical properties has also attracted attention of researchers.<sup>12,13</sup>

The need for biodegradable and biocompatible charged and/or conductive copolymers, in the biomedical field, has been pointed out by several studies. For example, conductive polymers can be used as materials in tissue engineering, including bone and nerve regeneration as a means to deliver electric stimuli while providing cell scaffolds.<sup>14</sup> Cationic polymers (conductive or not) are also of great interest for the delivery of genetic material.<sup>15</sup> In the context of pharmaceutical and biomedical applications, biocompatibility and biodegradability are important parameters. Polypyrroles and polythiophenes, the most studied conductive polymers, are not degradable. It is also the case with salen-based conductive polymers produced by electrochemical polymerization.<sup>16,17</sup> On the other hand, non-charged and non-conductive aliphatic polyesters are widely used in agricultural, biomedical, pharmaceutical and environmental applications; they exhibit excellent biodegradability and good biocompatibility.<sup>18</sup> Their degradation yields non-toxic by-products which are readily metabolized in the human body. Polypyrrole oligomers, linked by ester linkage, has been reported to be both semi-conductive ( $10^{-4}$  to  $10^{-5}$  less conductive than polypyrrole) and degradable.<sup>19</sup> The aim of this study was to synthesize biodegradable

copolymers of salicylidene. The synthesis was carried out by the addition of a biodegradable functional ester monomer to salicydenes moieties, to obtain a copolymer of aliphatic and aryl chain and metal complexed Schiff bases. This should represent a new family of conductive and/or charged biodegradable heteropolymers to be used for pharmaceutical or biomedical applications. This report will focus on the synthesis and characterization of this new polymer family.

### 2.1.2 Experimental Section

**1. General.** All reagents and solvents were obtained from commercial sources and used without further purification. Structure and composition of the synthesized compounds were determined using elemental analysis by the Laboratoire d'analyse élémentaire of the Université de Montréal with a Fisons Instrument, model EA 1108 CHN; by  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR using a Brüker ARX 400MHz spectrometer and by IR-FTIR using a Perkin-Elmer spectrometer. Gel Permeation Chromatography analysis were performed on a Waters system equipped with a refractometer detector, Waters Styragel GPC columns and using THF as the mobile phase at a rate of 1mL/min. Characterization of crystallinity of the copolymers was carried out by polarization microscopy using a polarizing microscope model Olympus B201 mounted with a CCD camera for image acquisition. Degradation onset was determined by thermogravimetry (TGA) using a Universal 2.5H TA instruments. DSC scans were acquired using a Seiko RDC-220 instrument. Samples were analyzed at a heating rate of 10°C/min using crimped aluminum pans. The instrument was calibrated for heat flow and temperature using gallium (Goodfellow, 99.99% pure), indium (Goodfellow, 99.999% pure) and tin (NIST, SRM2220). The melting temperature was obtained using an Electrothermal apparatus. A Contact Angle Meter Tante model Cam-Micro was used to determine the contact angles of the copolymers. Surface properties were imaged by AFM using a Nanoscope IIIa Dimension 3100 atomic force microscope (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) in tapping in air mode, using nanoprobe RTESPE7, with spring constant of 20–100 N/m and resonance frequency of 200–400 kHz. Cantilever length was

125  $\mu\text{m}$ . AFM measurements were conducted on thin polymer pellets prepared by using tablet press. To measure conductivity, a home-built system was used consisting of an auto-ranging picoamperometer (Keithley Instruments, Cleveland, Ohio, USA), a constant current generator and a chip of compacted polymers (thickness 0.6 to 1.2 mm) to which copper wire sticks were attached on each face with silver epoxy glue and connected in series. Conductivity (G) is expressed in Siemens.m<sup>-1</sup> and is calculated with the formula:  $G = I / (V \times m)$ , where I is the current intensity measured in Ampere, V the tension in Volt, m is the polymer chip thickness in meter.<sup>1</sup>

**2. Synthesis of (R,R)-N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-1,2-cyclohexanediamine (1a).** To a solution of potassium carbonate (12.64 g, 91 mmol) and trans-1,2-diaminocyclohexane (5.58 mL, 45.5 mmol) in water (20 mL) was added ethanol (65 mL) at room temperature. The resulting mixture was stirred until the reflux temperature had been reached (75°C). A solution of 2,5-dihydroxybenzaldehyde (12.57 g, 91 mmol) in ethanol (30 mL) was then added dropwise to the above reaction mixture. Stirring was refluxed for 14 h. Then, the mixture was cooled to room temperature. The solvent was removed by rotary evaporation. The mixture was extracted four times with ethyl acetate and water. The organic fractions were combined and the solvent was removed by rotary evaporation to give 9.68 g (60%) of golden crystals; mp 202-204 °C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-D<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 1.4 (m, 4 H, -CH<sub>2</sub>-, cyclohexane), 1.6 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-CHR-, cyclohexane), 1.8 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-CHR-, cyclohexane), 6.8-7.1 (m, 6 H, ArH), 8.5-8.6 (m, 2 H, -CH=N-), 8.6-8.8 (m, 2 H, OH ext) and 9.0-9.2 (m, 2 H, OH int); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-D<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 25 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, cyclohexane), 34 (-CH<sub>2</sub>-CHR-, cyclohexane), 73 (-CH<sub>2</sub>-CHR-, cyclohexane), 117.1(CH-CH-C(OH)int-), 117.4 (CR-CH-C(OH)-), 119 (CH-CH-C(OH)ext-), 121 (-CR=CH-C(OH)-), 150 (-N=CH-), 154 (=C(OH)ext-), and 166 (=C(OH)int-); HRMS (FAB) m/z 355.1646 (M<sup>+</sup>); C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 355.1652; Elemental analysis calculated: C, 67.8%; H, 6.3%; N, 7.9%. Found: C, 66.1%; H, 6.5%; N, 7.5%.

**N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-ethylenediamine (1b)** was synthesized as compound **1a** with ethylenediamine instead of trans-1,2-diaminocyclohexane to give 10.9 g (80%) of mauve crystals; mp 210-213 °C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) 3.8 (m, 4 H, -N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 6.6-6.8 (m, 6H, ArH), 8.5 (s, 2 H, -CH=N-), 8.7 (m, 2H, OH ext) and 8.9 (m, 2H, OH int); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) 60 (=N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N=), 117.2 (-C(OH)int-CH-CH-), 117.6 (CR-CH-C(OH)ext), 119 (C(OH)ext-CH-CH-), 121 (-C(OH)int=CR-CH-), 150 (-N=CH-), 154 (C(OH)ext), and 167 (C(OH)int); Elemental analysis calculated: C, 64%; H, 5.4%; N, 9.3%. Found: C, 63.5%; H, 5.6%; N, 9.3%.

**(R,S)-N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-meso-1,2-diphenylethylenediamine (1c)** was synthesized as compound **1a** with meso-1,2-diphenylethylenediamine instead of trans-1,2-diaminocyclohexane to give 12.3 g (60%) of dark yellow crystals; mp 133 °C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) 5.0 (m, 2 H, ph-CH<sub>2</sub>-N=), 6.6-6.8 (m, 6 H, Ar(H)), 7.2-7.5 (m, 10 H, -ph(H)) 8.1- 8.3(m, 4H, Ar(OH)ext and CH=N) and 8.9 (m, 2 H, Ar(OH)int); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) 79 (ph-CH<sub>2</sub>-N=), 117.2 (-C(OH)int-CH-CH-), 117.6 (C(OH)ext-CH-CR-), 119 (C(OH)ext-CH-CH-), 121 (CH-CR-C(OH)int), 127-129 (-CH=), 141 (=CH-C=CH-) 150 (-CH=N-), 154 (-C(OH)ext), and 166 (-C(OH)int); HRMS (FAB) m/z 453.1825 C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 453.1809; Elemental analysis calculated: C, 74.3%; H, 5.3%; N, 6.2%. Found: C, 72.8%; H, 5.7%; N, 6.2%.

**meso-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethyl-1,2-diamine (d)** was prepared using the method of Kurz and Johnson.<sup>20</sup> To a solution of aluminum chloride (0.39 g, 2.9 mmol) and meso-1,2-diphenylethylenediamine (4.56 g, 0.02 mmol) in water (100 mL) was added hydrogen peroxide (50%) (0.05 mL, 1.45 mmol) at 0 °C. The resulting mixture was stirred for 3 h at 0 °C, and then 15 mL of HCl was added dropwise to the above reaction mixture. Stirring was continued for 1 h. The mixture was filtered and the precipitate was collected to give 4.8 g (98%) of a white powder; mp 264 °C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) 4.9 (m, 2 H, NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 7.4 (m, 4 H, -C(OH)=CH-), 7.7 (m, 4 H, -C(OH)=CH-CH=) and 9.0 (m, 4 H, NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) ) 57 (NH<sub>2</sub>-CRH-), 129 (C(OH)-CH), 130 (C(OH)-

CH-CH), 131 (-CH-CR-CH-) and 134 (C(OH)); Elemental analysis calculated: C, 68.8%; H, 6.6%; N, 11.5%. Found: C, 57.3%; H, 6.7%; N, 9.4%.

**(R,S)-N,N'-(2-hydroxysalicylidene)-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethyl-1,2-diamine (1d)** was synthesized as compound **1a** with meso-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethyl-1,2-diamine instead of trans-1,2-diaminocyclohexane. After the reaction, the mixture was filtered and the precipitate was collected to give 11.1 g (54%) of a yellow powder; mp 209°C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) 5.0 (s, 2 H, ph(OH)-CHR-N=), 6.8 (m, 4 H, C(OH)-CH-CH-), 7.2-7.5 (m, 16 H, -CH=) and 8.4 (s, 2 H, -CH=N-); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) 80 (ph(OH)-CRH-N=), 117 (-C(OH)-CH-CH-), 119 (-CH=CH-CH=CH-), 120 (C(N)-C(CH)=C(OH)), 129 (CH-CH-C(CH)-CH-) 130 (C(CN)-CH-CH-) 133 (-CH-CH-CH-C(OH)), 140 (C(OH)ext) 160 (C(OH)int) and 167 (-CH=N-). Elemental analysis calculated: C, 74.3%; H, 5.3%; N, 6.2%. Found: C, 79.6%; H, 5.9%; N, 6.6%.

**3. Synthesis of (R,R)-N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-1,2-diaminocyclohexane manganese (2a).** A reaction flask containing manganese acetate tetrahydrate (5.44 g, 22 mmol) in ethanol (50 mL) was warmed gently to reflux temperature (75°C). To this warm solution, was added dropwise a solution of **1a** (2.59 g, 7.3 mmol) in ethanol (25 mL). The reaction mixture was stirred and refluxed for 14h. The mixture was then cooled to room temperature, and the solvent was removed by rotary evaporation. The mixture was washed two times with acetone followed by water. The precipitate was collected to give 2.85 g (95%) of a green powder; mp >300 °C. Elemental analysis calculated: C, 59.0%; H, 4.9%; N, 6.9%. Found: C, 55.6%; H, 5.2%; N, 5.7%.

**(R,R)-N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-1,2-diaminocyclohexane zinc (2b)** was prepared as compound **2a** with zinc acetate dihydrate instead of manganese acetate tetrahydrate to give 2.9 g (96%) of a green powder; mp >300 °C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) 1.4-1.5 (m, 4 H, -CH<sub>2</sub>-, cyclohexane), 1.6-1.7 (m, 4 H, -CH<sub>2</sub>-CHR-, cyclohexane), 1.8 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-CHR-, cyclohexane), 6.8-7.1 (m, 6 H, ArH), 8.6 (m, 2H, -N=CH-) and 8.8 (m, 2 H, AR(OH)ext); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) 24 (-CH<sub>2</sub>-, cyclohexane), 26 (-

$\text{CH}_2\text{-CHR}$ , cyclohexane), 65 ( $\text{-CH}_2\text{-CHR}$ , cyclohexane), 119 ( $=\text{C}(\text{O})\text{-CH=CH-}$ ), 123 ( $\text{C}(\text{OH})\text{ext-CH-CH}$ ) 145 ( $\text{CR-CH-C}(\text{OH})\text{-}$ ), 162 ( $\text{-CH=N-}$ ), 165 ( $\text{-C}(\text{OH})\text{ext-}$ ), and 176 ( $=\text{C}(\text{O-Zn})\text{int-}$ ); Elemental analysis calculated: C, 56.5%; H, 4.8%; N, 6.7%. Found: C, 55.6%; H, 5.2%; N, 5.7%.

**(R,R)-N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-1,2-diaminocyclohexane copper (2c)** was prepared as compound **2a** with copper acetate monohydrate to give 2.7 g (88%) of a green powder; mp  $>300^\circ\text{C}$ ; Elemental analysis calculated: C, 57.8%; H, 4.8%; N, 6.7%. Found: C, 49.1%; H, 5.4%; N, 5.4%.

**N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-ethylenediamine manganese (2d)** was prepared as **2a** with **1b** instead of **1a** to give 1.4 g (56%) of a pink powder; mp  $>300^\circ\text{C}$ ; Elemental analysis calculated: C, 54.4%; H, 4.0%; N, 7.9%. Found: C, 49.2%; H, 4.2%; N, 6.6%.

**N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-ethylenediamine zinc (2e)** was prepared as compound **2b** with **1b** instead of **1a** to give 2.4 g (90%) of a pink powder; mp  $>300^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm) 3.7 (m, 4 H,  $\text{-N-CH}_2\text{-}$ ), 6.4 (m, 4 H, ArH), 6.6 (m, 2 H,  $\text{-C}(\text{OH})\text{-CH-CR}$ , Ar), 8.2 (s, 2 H,  $\text{-CH=N-}$ ) and 8.4 (m, 2 H, Ar(OH)ext); Elemental analysis calculated: C, 52.8%; H, 3.9%; N, 7.7%. Found: C, 51.9%; H, 3.1%; N, 7.4%.

**N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-ethylenediamine copper (2f)** was prepared as **2c** with **1b** instead of **1a** to give 0.7 g (25%) of a brown powder; mp  $>300^\circ\text{C}$ ; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3400, 1558, 1432, 1406, 1340, 1238, 1047, 931 and 823; Elemental analysis calculated: C, 53.1%; H, 3.9%; N, 7.7%. Found: C, 50.2%; H, 3.3%; N, 6.9%.

**(R,S)-N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-meso-1,2-diphenylethylenediamine manganese (2g)** was prepared as **2a** with **1c** instead of **1a** to give 3.7 g (80%) of a green powder; mp  $>300^\circ\text{C}$ ; Elemental analysis calculated: C, 66.5%; H, 4.8%; N, 5.5%. Found: C, 60.5%; H, 4.8%; N, 6.0%.

**(R,S)-N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-meso-1,2-diphenylethylenediamine zinc (2h)** was synthesized as **2b** with **1c** instead of **1a** to give 0.4 g (10%) of a yellow powder; mp 295 °C ; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) 4.9 (d, 2 H, ph-CH<sub>2</sub>R-N=), 6.3-6.5 (m, 2 H, -C(O)int-CH-CH-), 6.7 (d, 2 H, C(O)int-CH-CH-), 6.9 (d, 2 H, C(OH)ext-CH-CR-), 7.1 (m, 5 H, ArH), 7.3 (m, 5 H, ph(H) and 8.3 (m, 2 H, -CH=N-); Elemental analysis calculated: C, 65.2%; H, 4.3%; N, 5.4%. Found: C, 56.2%; H, 3.7%; N, 4.3%.

**(R,S)-N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-meso-1,2-diphenylethylenediamine copper (2i)** was synthesized as **2c** with **1c** instead of **1a** to give 3.7 g (87%) of a brown powder; mp >300 °C; Elemental analysis calculated: C, 65.4%; H, 4.3%; N, 5.4%. Found: C, 59.1%; H, 4.8%; N, 5.7%.

**(R,S)-N,N'-(2-hydroxysalicylidene)-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethyl-1,2-diamine manganese (2j)** was synthesized as for compound **2a** with **1d** instead of **1a** to give 2.9 g (80%) of a brown powder; mp 223 °C ; Elemental analysis calculated: C, 66.5%; H, 4.4%; N, 5.5%. Found: C, 66.6%; H, 5.0%; N, 4.9%.

**(R,S)-N,N'-(2-hydroxysalicylidene)-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethyl-1,2-diamine zinc (2k)** was synthesized as **2b** with **1d** instead of **1a** to give 3.7 g (99%) of a yellow powder; mp 274 °C ; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) 5.2 (m, 2 H, A), 6.7 (d (J; 5.8 Hz) , 2 H, B), 6.8 (dd (J; 5.8 and 3.1 Hz), 4 H, C), 6.8-7.0 (d (J; 3.1 Hz) , 2 H, D), 7.1-7.3 (m, 8 H, E) and 8.2 (s, 2 H, F); Elemental analysis calculated: C, 65.2%; H, 4.3%; N, 5.4%. Found: C, 55.8%; H, 4.8%; N, 3.9%.

**(R,S)-N,N'-(2-hydroxysalicylidene)-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethyl-1,2-diamine copper (2l)** was synthesized as **2c** with **1d** instead of **1a** to give 2.3 g (60%) of a pink powder; mp >300 °C; Elemental analysis calculated: C, 65.4%; H, 4.3%; N, 5.4%. Found: C, 64.9%; H, 4.6%; N, 5.4%.

**4. Synthesis of copolymer (R,R)-N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-1,2-diaminocyclohexane manganese-co-adipoyl (3a)** To a suspension of **2a** (0.64 g, 1.56 mmol) in acetone (25 mL) was added adipoyl dichloride (0.45 mL, 3.1 mmol) and triethylamine (0.43 mL, 3.1 mmol). The resulting mixture was stirred at reflux temperature (50 °C) for 2 h. Then, the mixture was cooled to room temperature and the solvent was removed by rotary evaporation. The mixture was washed three times with water then with acetone and was collected to give 0.3 g (30%) of a brown powder; mp >300 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) C=O ester 1747; Elemental analysis calculated: C, 60.4%; H, 5.1%; N, 5.9%. Found: C, 61.9%; H, 5.9%; N, 6.4%.

The copolymer **(R,R)-N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-1,2-diaminocyclohexane-zinc-co- adipoyl (3b)** was synthesized as **3a** with **2b** instead of **2a** to give 0.3 g (40%) of a brown powder; mp >300 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) C=O ester 1746; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) 0.5 (m, 4 H, -CH<sub>2</sub>-, cyclohexane), 1.3 (m, 4 H, -CH<sub>2</sub>-CHR-, cyclohexane), 1.7 (m, 4 H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO-, adipoyl), 2.0 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CHR-, cyclohexane), 2.3 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO-), 5.8 (m, 2H, -C(O)int-CH-CH-), 6.5 (m, 2 H, C(O)int-CH-CH-), 7.2 (m, 2 H, C(OH)ext-CH-CH-) and 8.2 (m, 2 H, -N=CH-); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) 24 (-CH<sub>2</sub>-, cyclohexane), 25 (-CH<sub>2</sub>-CHR, cyclohexane), 26 (-CH<sub>2</sub>-CHR, cyclohexane), 31 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO-, adipoyl) 120 (-C(OH int)-CH=CH-), 124 (C(Oext)-CH=CH-), 128 (-CO=CH-CH=), 145 (-CO=CR-), 164 (=C(O-Zn)-), 176 (-CH=N-), 192 (-CH<sub>2</sub>-COO-), and 207 (-CH<sub>2</sub>-COO-); Elemental analysis calculated: C, 59.2%; H, 5.0%; N, 5.3%. Found: C, 52.7%; H, 5.2%; N, 3.8%.

The copolymer **(R,R)-N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-1,2-diaminocyclohexane-copper-co- adipoyl (3c)** was synthesized as **3a** with **2c** instead of **2a** to give 0.4 g (47%) of a brown powder; mp >300 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) C=O ester 1746; Elemental analysis calculated: C, 59.4%; H, 5.0%; N, 5.3%. Found: C, 57.2%; H, 5.7%; N, 4.9%.



The copolymer **N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-ethylenediamine-manganese-co-adipoyl (3d)** was synthesized as **3a** with **2d** instead of **2a** manganese to give 0.58 g (90%) of brown powder; mp >300 °C; Elemental analysis calculated: C, 56.8%; H, 4.8%; N, 6.0%. Found: C, 54.4%; H, 5.0%; N, 8.4%.

The copolymer **N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-ethylenediamine-zinc-co-adipoyl (3e)** was synthesized as **3a** with **2e** instead of **2a** to give 0.67 g (91%) of a brown powder; mp >300 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) C=O ester 1695; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) 1.7 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO-), 2.1 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO-), 3.7 (m, 4 H, -N-CH<sub>2</sub>-), 6.4 (m, 4 H, ArH), 6.6 (m, 2 H, -C(OH)-CH-CR, Ar), 8.2 (s, 2 H, -CH=N-) and 8.4 (m, 2 H, Ar(OH)ext); Elemental analysis calculated: C, 55.5%; H, 4.7%; N, 5.8%. Found: C, 54.8%; H, 5.4%; N, 6.2%.

The copolymer **N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-ethylenediamine-copper-co-adipoyl (3f)** was synthesized as for compound **3a** with **2f** instead of **2a** to give 0.60 g (80%) of a brown powder; mp >300 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) C=O ester 1708; Elemental analysis calculated: C, 55.8%; H, 4.7%; N, 5.9%. Found: C, 53.2%; H, 4.0%; N, 6.2%.

**5. Synthesis of copolymer (R,S)-N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-meso-1,2-diphenylethylenediamine-manganese-co-terephthaloyl (4a).** The copolymer (R,S)-N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-ethylenediamine manganese-co-terephthaloyl was synthesized as **3a** with terephthaloyl chloride instead of adipoyl chloride, and with **2g** instead of **2a** to give 0.98 g (99%) of a brown powder; mp >300 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) C=O ester 1789; Elemental analysis calculated: C, 68%; H, 3.8%; N, 4.4%. Found: C, 58.4%; H, 5.7%; N, 4.6%.

The copolymer **(R,S)-N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-meso-1,2-diphenylethylenediamine zinc-co-terephthaloyl (4b)** was synthesized as **4a** with **2h** instead of **2a** to give 0.33 g (33%) of a yellow powder; mp >300 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) C=O ester

1791; Elemental analysis calculated: C, 66.9%; H, 3.7%; N, 4.3%. Found: C, 66.8%; H, 5.4%; N, 5.1%.

The copolymer **(R,S)-N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-meso-1,2-diphenylethylenediamine copper-co-terephthaloyl (4c)** was prepared similarly to **4a** with **2i** instead of **2a** to give 0.94 g (94%) of a brown powder; mp >300 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) C=O ester 1789; Elemental analysis calculated: C, 67%; H, 3.7%; N, 4.3%. Found: C, 62%; H, 4.2%; N, 3.8%.

The copolymer **(R,S)-N,N'-(2-hydroxysalicylidene)-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethyl-1,2-diamine- manganese-co-terephthaloyl (4d)** was synthesized d **4a** with **2j** instead to **2a** to give 0.98 g (99%) of a brown powder; mp >300 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) C=O ester 1789; Elemental analysis calculated: C, 68%; H, 3.8%; N, 4.4%. Found: C, 60%; H, 7.1%; N, 5.6%.

The copolymer **((R,S)-N,N'-(2-hydroxysalicylidene)-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethyl-1,2-diamine- zinc-co-terephthaloyl (4e)** was synthesized as **4a** with **2k** instead of **2a** to give 0.98 g (25%) of a beige powder; mp >300 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) C=O ester 1789; Elemental analysis calculated: C, 66.9%; H, 3.7%; N, 4.3%. Found: C, 63.7%; H, 3.4%; N, 1.1%.

The copolymer **(R,S)-N,N'-(2-hydroxysalicylidene)-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethyl-1,2-diamine-copper-co-terephthaloyl (4f)** was synthesized as described for **4a** with **2l** instead of **2a** to give 0.99 g (99%) of a grey powder; mp >300 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) C=O ester 1789; Elemental analysis calculated: C, 67%; H, 3.7%; N, 4.3%. Found: C, 64.6%; H, 5.0%; N, 4.1%.

**6. Cytocompatibility studies; Cell lines.** RAW 264.7 murine macrophage cell lines (American Type Culture Collection, Rockville, USA) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum and

Penicillin/Streptomycin (Gibco, USA). The cells were grown in tissue culture flasks and incubated at 37 °C in a 5% carbon dioxide atmosphere.

**Proliferation assays.** Polymers dissolved in 10 µl dimethyl sulfoxide (DMSO) were added in the wells on a 96 well-flat bottomed microplate (Corning, NY, USA), in triplicate. The amounts tested were: 250µg; 100µg; 10µg; 1µg; 0.1µg and 0.01µg. DMSO was subsequently removed under vacuum. RAW 264.7 cells were diluted in complete medium at a final concentration of  $5 \times 10^5$  cells/mL and plated (100µl/well). The plates were incubated for 24 hours after which cell proliferation was assessed with MTT assay.<sup>21</sup> Briefly, 10µl of thiazolyl blue tetrazolium bromide (Sigma, St-Louis, MO, USA) dissolved in PBS (10 mM, pH 7.4) at a concentration of 5 mg/mL and filtered on 0.22µm sterile filter (Millipore, Bedford NMA USA), was added to each well. After three hours incubation time at 37 °C in 5% carbon dioxide atmosphere, 50 µL of solution (Isopropanol, 10% Triton 100X, 0.1 N HCl) was added to each well to dissolve the dark blue formazan crystals. Absorbance was read at a 570 nm wavelength on a microplate reader (SAFIRE, Tecan, Austria). To evaluate the presence of potential toxic leachable components, polymer extracts were prepared. Briefly, 12 to 20 mg of polymers or salens were incubated in 1 mL DMEM supplemented with serum at 37°C for 2 to 72 h. Extracts were sterile filtered and serially diluted. Extracts were added to RAW 264.7 cells plated on a 96 wells microplate. After 24 h incubation, cell proliferation and cell lysis were assessed using MTT and LDH assays. Cell growing pattern was followed in routine examination with optical inverted microscope (Axiovert S100, Zeiss, Germany).

**Lysis assays.** The presence of lactate dehydrogenase (LDH) in the supernatant obtained from proliferation assays was used as an indicator of cell lysis and death and determined using a commercial dosing kit (Sigma, St-Louis, MO, USA) used as directed by the manufacturer. Briefly 5 µl of supernatant were transferred to a new microplate and incubated with the reaction mixture for 30 minutes. The reaction was stopped with 0.1N HCl. Microplates were read using a microplate reader (SAFIRE, Tecan, Austria), at the

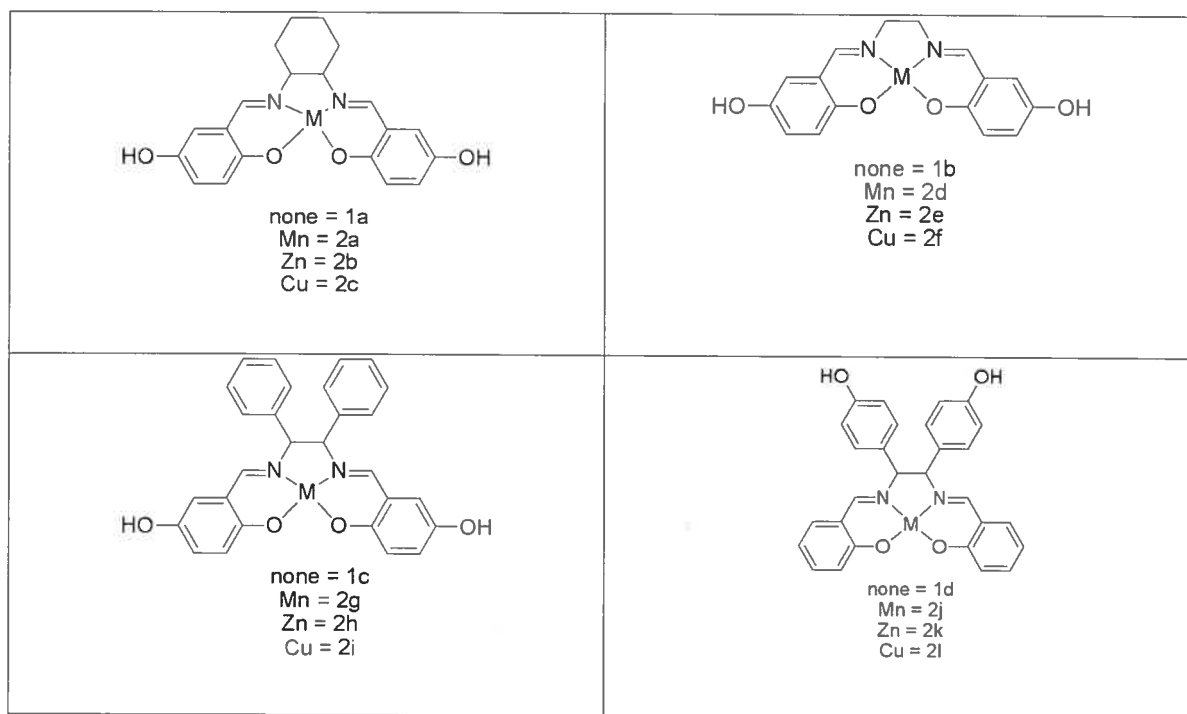
wavelength of 450 nm (reference wavelength at 690 nm). Results are plotted in reference to positive control wells, 100% Triton 100X lysed cells.

### 2.1.3 Results and Discussion

*General synthesis approach.* Four different Schiff bases were synthesized based on the salicylidene tetradentate ligand derived from salicylaldehyde and diamines. Moderate to good yields of salicylidene monomer were obtained using a modified Larrow and Jacobsen method.<sup>22</sup> Different reagents were used, such as 2,5-dihydroxybenzaldehyde, to obtain salen structure with additional alcohol groups. Some modifications to the Jacobsen purification process were done to adapt it to the polarity of these new compounds. The structures of the monomers were confirmed by <sup>1</sup>H-NMR; for example, loss of the aldehydic proton on the 2,5-dihydroxybenzaldehyde at 9.9 ppm and replacement by the proton signal at 8.5 ppm, due to the proton (-N=CH-). In addition, the four protons (3.5 ppm) of the reactive amines have also disappeared, as expected (spectra not shown). The typical 2 N-H bond bands of the reactive amine at vibration wavelength 3300 cm<sup>-1</sup> disappeared in the FT-IR spectrum of final salicylidene compounds. Elemental analysis confirmed the proposed structure. For example, the compound **1a** has 67.8% of carbon, 6.3%; of hydrogen and 7.9% of nitrogen and we found respectively 66.1% of C, 6.5% of H and 7.5% of N which is within the 5% error margin. However, the elemental analysis of compound **d** showed a large difference with the predicted values, probably due to the presence of HCl impurity.

Salicylidenes were thus complexed with selected metals (Figure 1). As the complexes with Mn and Cu are paramagnetic and they are unsuitable for NMR characterization. Complexes with Zn (diamagnetic) were synthesized to serve as a model compound to enable characterization by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR. Prior to metal complexation, the hydroxyl proton NMR signals of salicylidene consisted of a multiplet peak at 9.0-9.2 for the two 2, 2' protons (internal) that are hydrogen-bonded and another multiplet peak at 8.6-8.8 for the 5 and 5' protons (external). Proof of complexation can be seen by <sup>1</sup>H NMR with

the disappearance of the two hydroxyl protons at positions 2 and 2' for compound **2b**. Only the proton signal corresponding to the external protons is visible after complexation (spectra not shown). Confirmation of the composition of the coordinated salicylidene metal complexes was obtained by elemental analysis. However, for some complexes, water molecules are coordinated to the metal: two molecules of water for complexes **2a**, **2b**, **2d**, **2g**, **2i** and four for **2c**, **2h**, **2k**.



**Figure 1. The salicylidenes and metal complexes.**

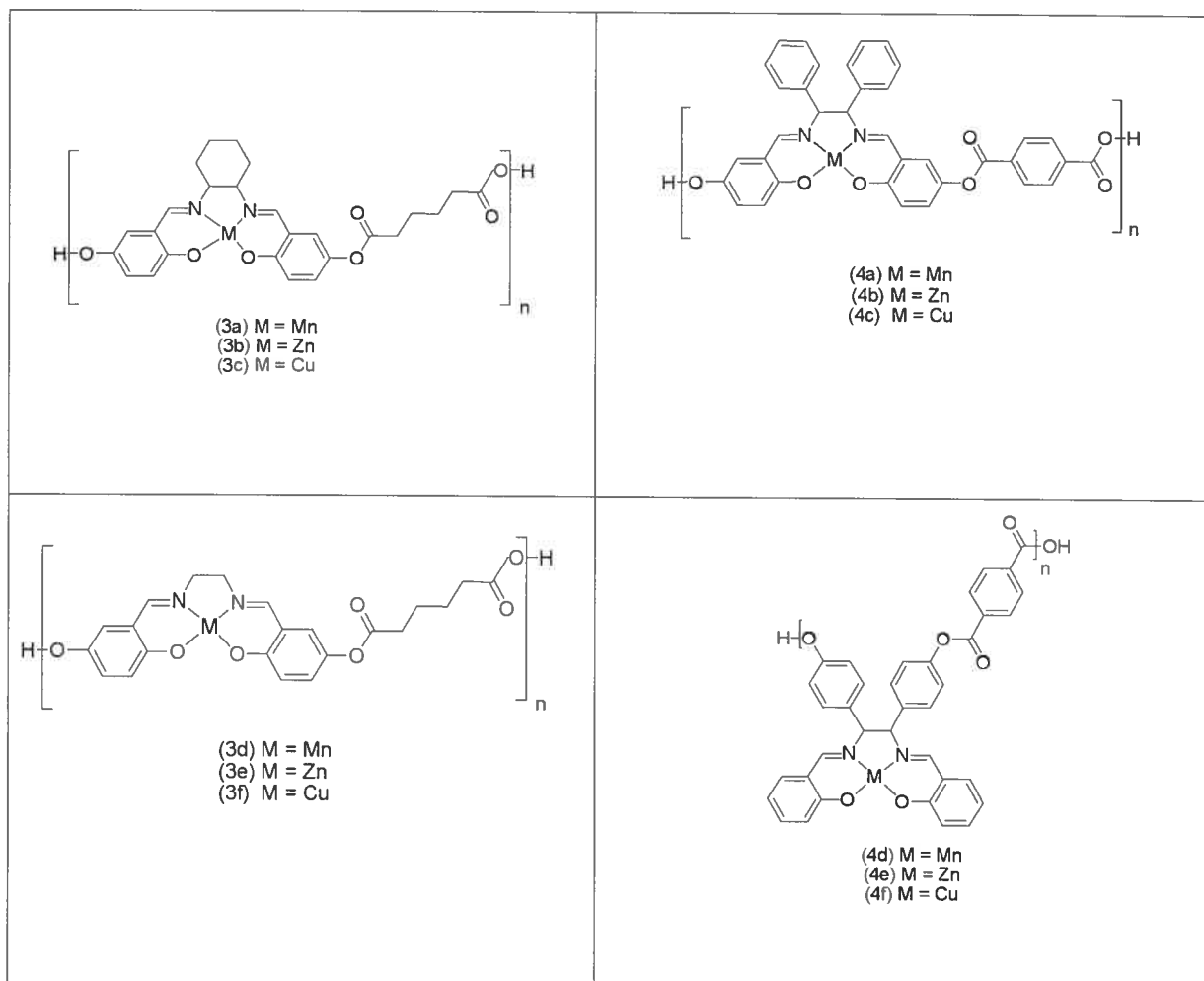
The linear coordinated metal copolymers were formed by polycondensation through esterification of the alcohol on Schiff base with different diacids under basic conditions (Figure 2). These reactions are mechanistically well understood. Each reaction involves nucleophilic addition to the carbonyl group, facilitated by the polar nature of the carbon-oxygen double bond, the ability of the carbonyl oxygen atom to assume a formal negative

charge, and the planar configuration of the trigonal carbon that minimizes steric hindrance. Confirmation of the polymerization can be seen by  $^1\text{H-NMR}$ , with the disappearance of the hydroxyl proton of the metal complex at 8.8 ppm (spectra not shown). The molecular weights have been determined by Gel Permeation Chromatography, giving  $M_w$  between 30 and 60 kDa (Table 1). Formation of the new ester bond was detected by FT-IR, with peaks in the range of  $1638\text{--}1791\text{ cm}^{-1}$  characteristic of the  $\text{C=O}$  stretch vibration. The copolymers based on terephthaloyl could not be characterized by NMR because they are poorly soluble in organic solvents, but GPC (Table 1) and FTIR results confirmed their polymeric nature. Elemental analyses of the linear copolymers are consistent with the proposed structures. However, as observed for metal complex monomer, water molecules were coordinated to the metal complex present in the copolymer (two molecules of water for polymers **4a**, **4c**, **4d** and four for polymer **3b** per metal complex). Hydrates are thus conserved after polymerization.

**Table 1. Gel Permeation Chromatography results**

<i>Sample</i>	<i>M<sub>n</sub></i>	<i>M<sub>w</sub></i>	<i>Pd</i>
3a	40 400	58 700	1.45
4c	44 200	57 500	1.30
4d	31 200	36 200	1.16
4f	23 800	31 100	1.30

\* *M<sub>n</sub>* : Molecular number; *M<sub>w</sub>* : Molecular weight; *Pd* : polydispersity



**Figure 2. The alternating linear copolymers**

*Thermal analysis.* Experimentally, the melting points of the Schiff bases were about 200°C. When Schiff bases were metal complexed, the melting point increased to 223°C. The thermal stability is dependent on the aromaticity of salicylidene. Complexation increases its aromaticity and, therefore, its stability follows the same trend.

Thermal analysis using DSC shows high  $T_g$  values for all polymers ( $150 \pm 10^\circ\text{C}$ ) with no significant differences between the co-adipoyl and co-terephthaloyl polymers. The

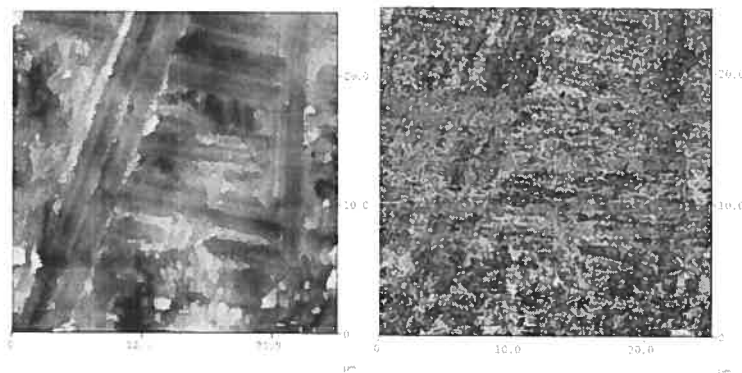
high  $T_g$  values can be explained by the rigidity of the aromatic rings and intermolecular interactions.

Thermal stability depends on the bond energies of each molecule. The vibrational energy increases proportionally with temperature to reach the breaking point. Breaking the C-C bonds of linear polymer requires less energy than to break the bonds of polymer with cyclo-aromatic groups, since electronic delocalization is high in these groups and the bonds are thus stronger. For a polymer to be considered thermally stable or heat resistant, it should not decompose below 400°C and it should retain its useful properties at temperatures near the decomposition temperature.<sup>23</sup> Thermogravimetric analysis suggests that all the copolymers have good thermal stability since their temperatures of decomposition are above 200°C. However, these copolymers cannot be considered heat resistant. The decomposition of the adipoyl and the terephthaloyl segments starts respectively at 250°C and 300°C, except for compound **4c** for which TGA analysis showed a decomposition temperature starting at 800°C. A second signal at 1000°C corresponding to the decomposition temperature of metal complexes can be observed. The TGA results suggested that terephthaloyl copolymers have improved stability relative to the co-adipoyl based copolymers.

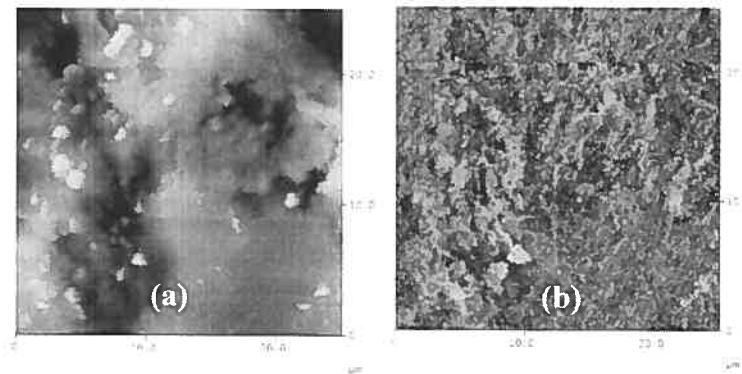
*Surface analysis.* All the copolymers were found to be semi-crystalline as evidenced by the presence of some crystals and some amorphous zone under polarizing microscopy (data not shown). AFM was used to characterize polymer surface microstructure in topography (Figure 3a and 4a) and phase mode (Figure 3b and 4b). While topography gives height cartography of the polymer surface, the phase signal is most sensitive to mechanical properties.<sup>24</sup> The surface analysis using AFM tapping in air mode confirmed the semi-crystalline character of the polymer **4d** (linear structures on Figure 3a). Similar structures were observed for polymer **4f** (Figure 4a); however, they were less clear. In phase detection mode, the surface was found non-homogeneous, showing phase separation. In a previous study on salen grafted polymers, we have shown that lighter zones in phase detection are



characteristic of the presence of metal co-ordinated salen.<sup>24</sup> We indeed observed these light zones indicating the presence of metal complex section.<sup>24</sup> Meanwhile, dark zones in phase images (Figure 3b & 4b) may indicate the presence of hydrophobic terephthalic rings.

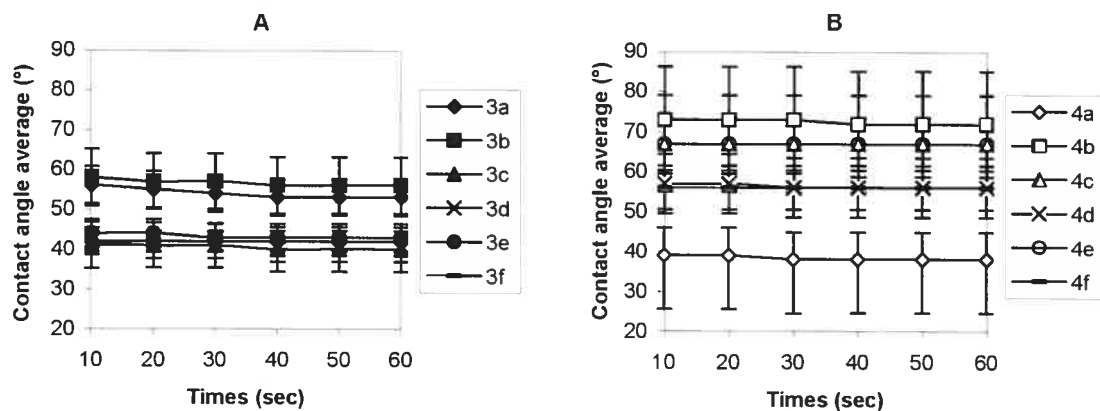


**Figure 3. AFM topographic (a) and phase (b) images of polymer 4d slab, illustrating the semi-crystalline character of polymer.**



**Figure 4. AFM topographic (a) and phase (b) images of polymer 4f slab, illustrating the presence of metal in the light region in the AFM phase image. The particles present in the AFM topographic image are light in phase images indicating the presence of salicylidene metallic complexes.**

Static contact angle was performed to determine the polymers wettability. This property greatly influences the biomaterial interactions with cells and proteins. Contact angles from 40 to 80° have been reported to favor general cell adhesion.<sup>19,25</sup> A drop of water was deposited on a polymer chip, allowed to equilibrate and the measurements were then carried out ( $n = 10$ ). All polymers displayed contact angles between 40 and 75°, thus potentially favoring cell adhesion (Figure 5). The hydrophobic character is due to the presence of the adipoyl and aromatic groups and can be predicted from the structure. The terephthaloyl polymers are more hydrophobic than the alidipoyl polymers. However, we were not able to correlate the type of the metal with the wettability of the polymer.



**Figure 5. Contact angle average and standard deviation for polymers 3a to 3f (Figure 5A) and 4a to 4f (Figure 5B).**

*Conductive nature of polymers.* The conductivity of polymers is not a well-understood phenomenon. However, some molecular arrangements are recognized to favor conductivity. In general, conductive polymers contain conjugated double or triple bonds on aromatic moieties to allow delocalization of the charge<sup>1,23</sup> and hence continuous attractive

or electro-donating agents increases the conductivity. The configuration, conformation and molecular arrangement also influence the conductivity.<sup>1,23</sup> The polysalicylidene copolymers were expected to be intrinsically conductive polymers since they allow electron mobility. A constant current was applied between opposite face of compacted polymer disc, and the current was measured to calculate conductivity values (Table 2). Polymers **4a**, **4d** and **4f**, showed conductivity readings between  $10^{-4}$  and  $10^{-6}$  S/m and can be considered as clearly semi-conductive (comparable to thiophene polymers<sup>26</sup>), while, **3c**, **3d**, **3e** and **3f** with conductivity around  $10^{-8}$  S/m can be found weakly semi-conductive. Other polymers with conductivity readings between  $10^{-9}$  and  $10^{-10}$  S/m can be considered close to insulators (comparable to glass).<sup>1</sup> The linear polymers with terephthaloyl as co-monomer have the greater conductivity. This could be explained by their higher aromaticity and conjugation compared to the adipoyl-based polymers.<sup>27</sup> The conductivities of polymers with manganese or copper as coordinated metals were about the same (Table 2). Taking together results of conductivity and AFM surface analysis, seem to indicate that conductivity is not related to the crystallinity. It was also found that conductivity is not related to  $M_w$  (Table 1).

**Table 2. Conductivity results**

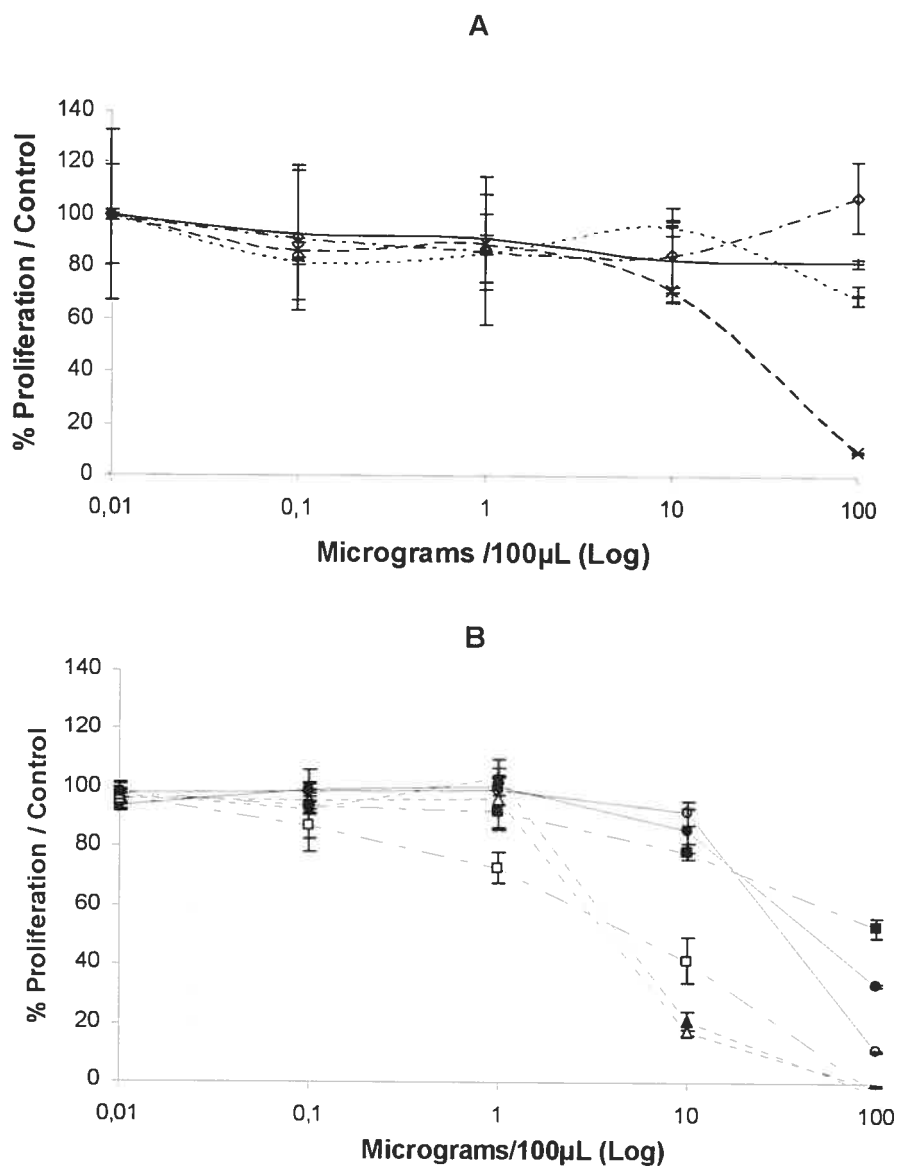
	<i>Current intensity (A)</i>	<i>Conductivity : G (S/m)</i>
<b>Reference *</b>	0.7643	-
<b>3 a</b>	$1.82 \cdot 10^{-09}$	$1.61 \cdot 10^{-09}$
<b>3 b</b>	$4.3 \cdot 10^{-10}$	$3.38 \cdot 10^{-10}$
<b>3 c</b>	$1.12 \cdot 10^{-08}$	$8.80 \cdot 10^{-09}$
<b>3 d</b>	$1.24 \cdot 10^{-08}$	$7.31 \cdot 10^{-09}$
<b>3 e</b>	$8.99 \cdot 10^{-08}$	$5.30 \cdot 10^{-08}$
<b>3 f</b>	$3.2 \cdot 10^{-08}$	$3.77 \cdot 10^{-08}$
<b>4 a</b>	$7.6 \cdot 10^{-06}$	$5.97 \cdot 10^{-06}$
<b>4 b</b>	$1.5 \cdot 10^{-09}$	$8.84 \cdot 10^{-10}$
<b>4 c</b>	$3.7 \cdot 10^{-09}$	$3.27 \cdot 10^{-09}$
<b>4 d</b>	$1.46 \cdot 10^{-04}$	$1.86 \cdot 10^{-04}$
<b>4 e</b>	$2.8 \cdot 10^{-10}$	$1.37 \cdot 10^{-10}$
<b>4 f</b>	$3.34 \cdot 10^{-05}$	$3.94 \cdot 10^{-05}$

\* Reference: closed circuit, (see figure 5)

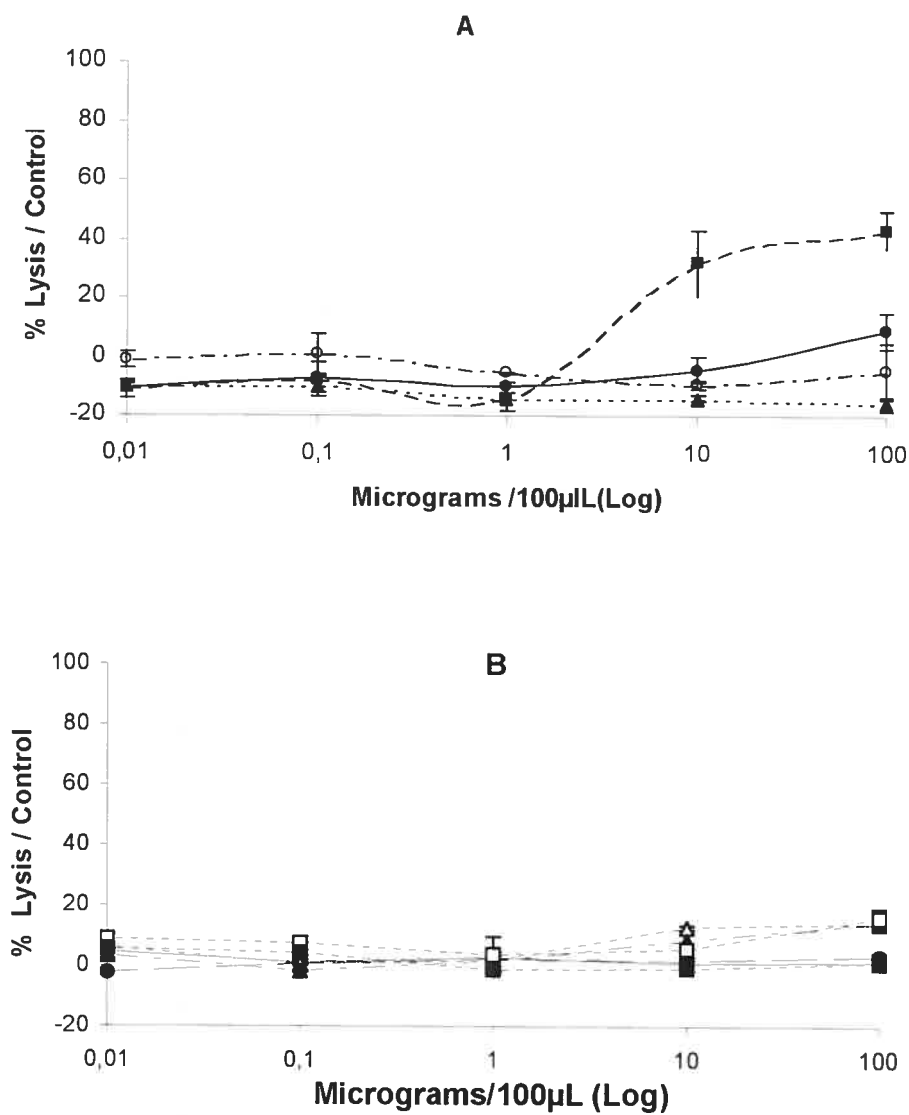
*Cytocompatibility assays.* Cytocompatibility of the conductive polymer **4a**, **4d** and **4f** was determined as described in the experimental section. Ester bonds can be cleaved in biological media, so we included here testing of the different monomers or potential degradation products (salens and terephthalic acid) which constitute the polymers. MTT colorimetric assay was used for the assessment of cell proliferation since it measures the tetrazolium ring cleavage by active mitochondria of living cells<sup>21</sup>, whereas, lactate dehydrogenase (LDH) measurement in cell supernatant indicates the level of cell lysis. Blank experiments showed no significant polymer absorbance at detection wavelength and in the concentration range studied. The graph of the cell proliferation and cell lysis assays

showed that the polymer and its degradation products are non-toxic in concentration lower than 100 $\mu$ g/mL (Figures 6b and 7b). At higher concentrations, all showed low toxicity except the **2g** salen which seemed to be more toxic than the others (Figure 6a). In the cell proliferation study, the salens are less toxic than the corresponding polymers. This suggests that the polymerization with terephthalic acid (TA) increased the toxicity or the resulting polymer had some residual reactant or solvent. In cell lysis assays, the toxicity of salen and corresponding polymer are the same (Figure 6a and b). The mix of TA and salen **2g** could represent the degradation products of **4a**. We found similar results for each polymer and their corresponding degradation mixtures. Microscopic observations of the macrophage monolayer during the study, showed no changes in cell morphology or growing patterns.

To test the hypothesis that the observed toxicity at high concentrations was due to leachable materials, i.e. solvent or unreacted products, polymer extracts were prepared and incubated with macrophages (data not shown). Indeed, the results showed that the toxicity observed at high polymer concentration seem to be due to leachable materials, probably unreacted monomers or solvents. A potential source of toxic materials is the salen coordinated metal, but is unlikely as these bonds are known to be very stable. The other possibility is the toxicity of the degradation products, but it is also unlikely as we found the same profile of toxicity regardless of the incubation length (2 or 72 hours). Although a complete degradation study of the polymers is yet to be completed, further investigations are also underway to identify these products. These results are encouraging but the tests are preliminary, and cytocompatibility will have to be assessed more thoroughly *in vitro* and *in vivo* considering the hydrophilicity of the polymers and the potential toxicity of the chelating metal. However, it is now possible to use these polymers in further studies to test biological applications.



**Figure 6. Cell Proliferation assays. (A) MTT assay of terephthalic acid (+), of salens (2g (X), 2j (—), 2l (◇)). (B) MTT assay of polymer (4a (○), 4d (Δ), 4f (□)) and the mixture of degradation product of 4a (●, means TA and salen 2g), 4d (▲, means TA and salen 2j) and 4f (■, means TA and salen 2l).**



**Figure 7. Cell Lysis assays. (A) LDH assay of terephthalic acid (+), of salen (2g (X) , 2j (—), 2l (◇)). (B) LDH assay of polymer (4a (○), 4d (Δ), 4f (□)) and the mixture of degradation product of 4a (●, means TA and salen 2g), 4d (▲, means TA and salen 2j) and 4f (■, means TA and salen 2l).**

### 2.1.4 Conclusion

Synthesis and characterization of new family of charged semi-crystalline polymers based on salicylidenes have been reported, and the structural characterizations have validated the proposed polymer structures. The hydrophilic/hydrophobic character, conductivity properties and thermal stability were determined. The surface properties are compatible with cell adhesion and growth and the *in vitro* biocompatibility studies showed promising results. Three copolymers based on terephthalic acid showed significant conductive properties. This paper constitutes the first report on a new family of charged biodegradable polymers. These polymers could have several applications in bone and nerve regeneration and DNA complexation and delivery. We recently described DNA complexed with salens-grafted-PLA, similarly, linear salicylidene polymers can be tested for their abilities to form DNA complexes.<sup>24</sup>

### 2.1.5 Acknowledgments

We are grateful to Dr Zhu and technician Julie Boivin (Université de Montréal) for GPC analysis, and to NSERC for financial support.

### 2.1.6 References

- (1) Skotheim, T. A.; Elsenbaumer, R. L.; Reynolds, J. R. *Handbook of conducting polymer*; second edition Eds ed., 1997.
- (2) Holliday, B. J.; Swager, T. M. *Chem. Commun.* **2005**, 23-36.
- (3) Cozzi, P. G. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, 410-421.
- (4) Canali, L.; Sherrington, D. D. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 28, 85-93.
- (5) Achard, T.; Belokon, Y. N.; Fuentes, J. A.; North, M.; Parsons, T. *Tetrahedron* **2004**, 60, 5919-5930.
- (6) Katsuki, T. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, 437-444.
- (7) Doctrow, S. R. *Adv. Pharmacol.* **1997**, 38, 247-269.
- (8) Sharpe, M. A. *Biochem. J.* **2002**, 366, 97-107.
- (9) Riley, D. P. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2573-2587.



- (10) Aubert, P. H.; Neudeck, A.; Dunsch, L.; Audebert, P.; Capdevielle, P.; Maury, M. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1999**, *470*, 77-88.
- (11) Miasik, J.; Hooper, A.; Tofield, B. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* **1996**, *82*, 1117-1139.
- (12) Kanis, D. R.; Ratner, M. A.; Marks, T. J. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 195-242.
- (13) Averseng, F.; Lacroix, P. G.; Malfant, I.; Dahan, F.; Natayani, K. *J. Mater. Chem.* **2000**, *10*, 1013-1018.
- (14) Collier, J. H.; Camp, J. P.; Hudson, T. W.; Schmidt, C. E. *Journal of Biomedical Materials Research*. **2000**, *50*, 574-584.
- (15) Lechardeur, D.; Verkman, A. S.; Lukacs, G. L. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2005**, *57*, 755-767.
- (16) Kingsborough, R. P.; Swager, T. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8825-8834.
- (17) Reddinger, J. L.; Reynolds, J. R. *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 1236-1243.
- (18) Swift, G.; Creamer, M.; Wei, X.; Yocom, K. *Macromol. Symp* **1998**, *130*, 379-393.
- (19) Rivers, T. J.; Hudson, T. W.; Schmidt, C. E. *Adv. Funct. Mater.* **2002**, *12*, 33-37.
- (20) Kurz, M. E.; Johnson, G. J. *J. Org. Chem* **1971**, *36*, 3184-3187.
- (21) Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55-63.
- (22) Larrow, J. F.; Jacobsen, E. N. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1939-1942.
- (23) Stevens, P. M. *Polymer chemistry: an introduction*; 2nd ed., 1990.
- (24) Nadeau, V.; Hildgen, P. *Molecules* **2005**, *10*, 105-113.
- (25) Wang, Y.-X.; Robertson, J. L.; Spillman, W. B., Jr.; Claus, R. O. *Pharmaceutical research* **2004**, *21*, 1362-1373.
- (26) Ng, S.C.; Chan, H.S.O.; Wong, P.M.L.; Tan, K.L.; Tan, B.T.G. *Polymer* **1998**, *39*, 4963-4968.
- (27) Kingsborough, R. P.; Swager, T. M. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 872-874.

## 2.2 But

L'objectif de cette section est de synthétiser de nouveaux polymères chargés, biodégradables et biocompatibles afin d'être utilisés en régénération tissulaire. La synthèse de copolymère de salen doit être simple et rapide. De plus, des preuves structurales doivent être apportées afin de confirmer l'obtention des biomatériaux désirés. Enfin, des études préliminaires sur la conductivité, la biocompatibilité et la biodégradabilité *in vitro* doivent être effectuées.

## 2.3 Résultats obtenus et complément d'information

La section qui suit est un résumé des résultats obtenus et acceptés pour publication en mars 2006 par la revue «Journal of Applied Polymer Science» sous le titre : Synthesis and characterization of biodegradable and charged salen-based polymers. Les auteurs sont : Véronique Nadeau, Jean-Michel Rabanel, Shilpa Sant, Roula Chahwan, Sophie-Dorothee Clas et Patrice Hildgen. De plus, certaines figures ainsi que quelques explications complémentaires ont été ajoutées afin de faciliter la compréhension de l'article.

### 2.3.1 Preuves de synthèses

#### 2.3.1.1 Synthèse des bases de Schiff

Quatre bases de Schiff différentes ont été synthétisées à partir de salicylidène et de diamine (**Figure 31, Page 85**). La synthèse de la base de Schiff **1a** a été mise au point par Roula Chahwan<sup>166</sup> (quatrième auteur) et inspirée par les méthodes de synthèse de Jacobsen.<sup>167</sup> Les conditions réactionnelles produisant la base de Schiff tel que décrit dans l'article 1 sont les mêmes que celles proposées par Jacobsen.<sup>167</sup> La purification de la base de Schiff présentée dans le protocole de Jacobsen a, par contre, nécessité quelques

modifications. D'abord, elle a été modifiée par Roula Chahwan, puis par moi-même, afin de l'adapter aux nouvelles structures synthétisées. La méthode d'isolation de Jacobsen consiste à filtrer sous vide le milieu réactionnel puis à laver la phase solide à l'aide d'éthanol. L'auteur propose de redissoudre le composé en présence de dichlorométhane suivie d'un lavage de la phase organique en milieu aqueux. Finalement, les solvants sont évaporés sous vides. Le caractère polaire causé par les groupements phénol des bases de Schiff synthétisées dans l'article 1 rend impossible l'utilisation de l'éthanol pour effectuer le lavage. Roula Chahwan proposa donc d'effectuer la trituration du milieu réactionnel en présence d'acétate d'éthyle sans passer par les étapes de recristallisation et d'extraction. Bien qu'à cette étape de synthèse, Roula Chahwan ait obtenu un excellent rendement (95%), les difficultés engendrées par la trituration m'ont incitée à modifier le protocole. Par conséquent, c'est par l'extraction d'une phase aqueuse à l'aide d'acétate d'éthyle qu'il a été possible d'isoler le salicylidène des résidus réactionnels. Cette modification mineure au protocole augmente légèrement le rendement de 95% à 98% mais facilite beaucoup le travail du chimiste.

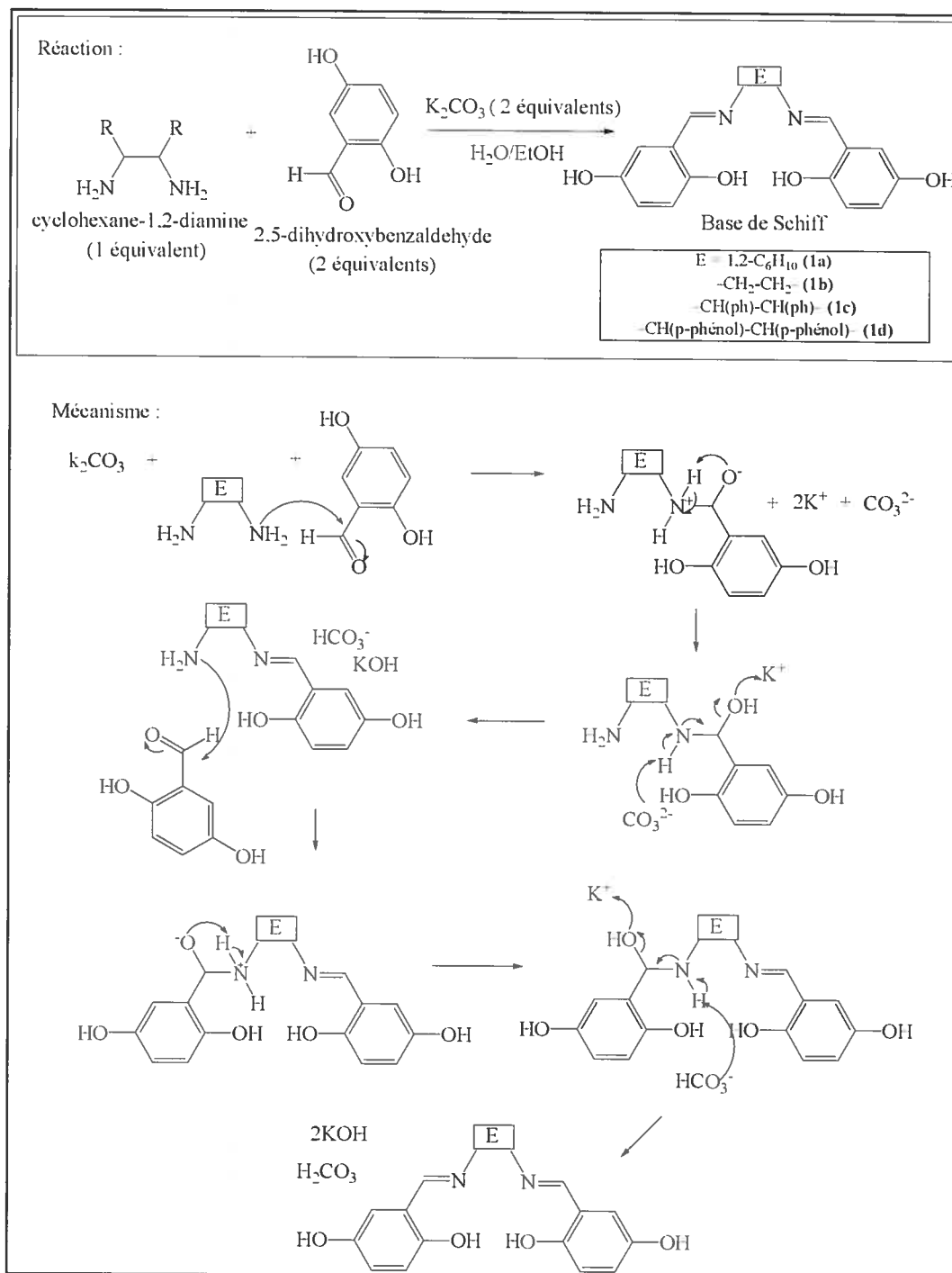
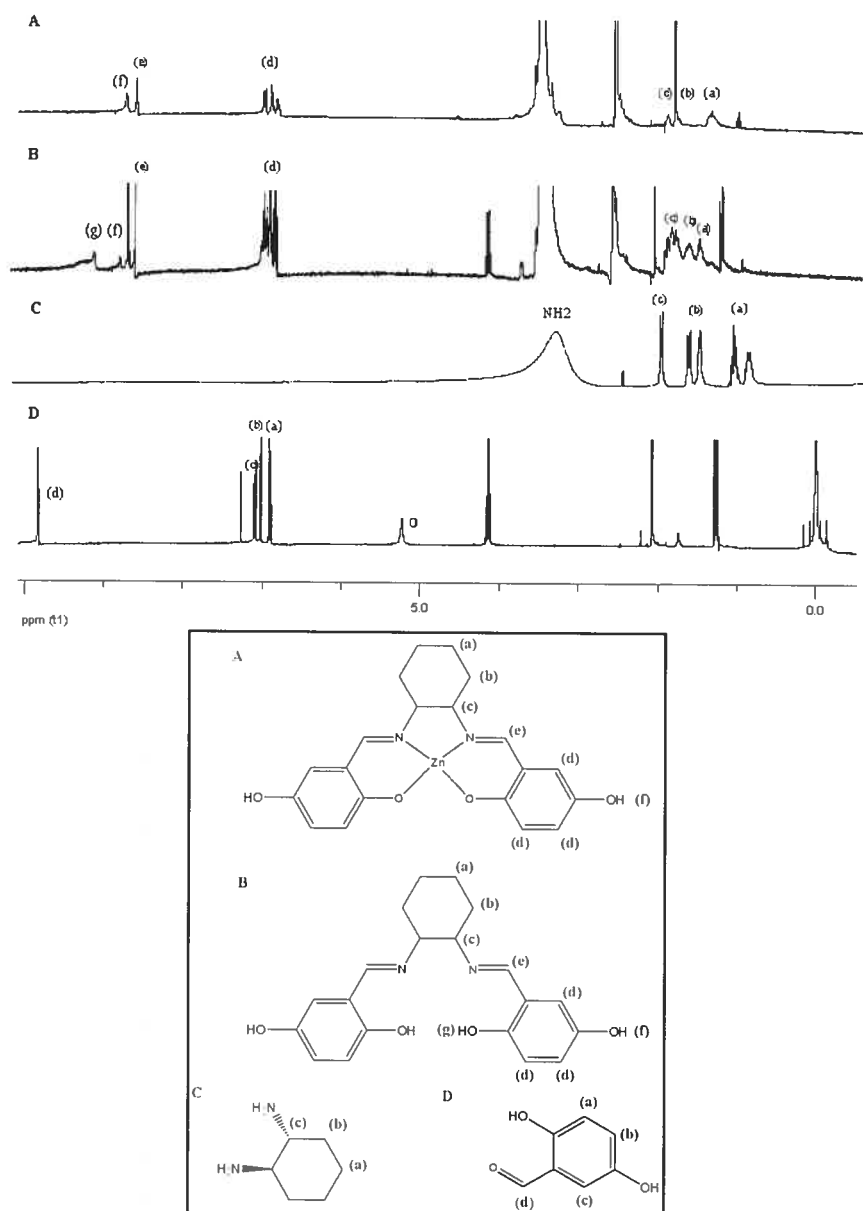


Figure 31. Mécanisme de formation des bases de Schiff

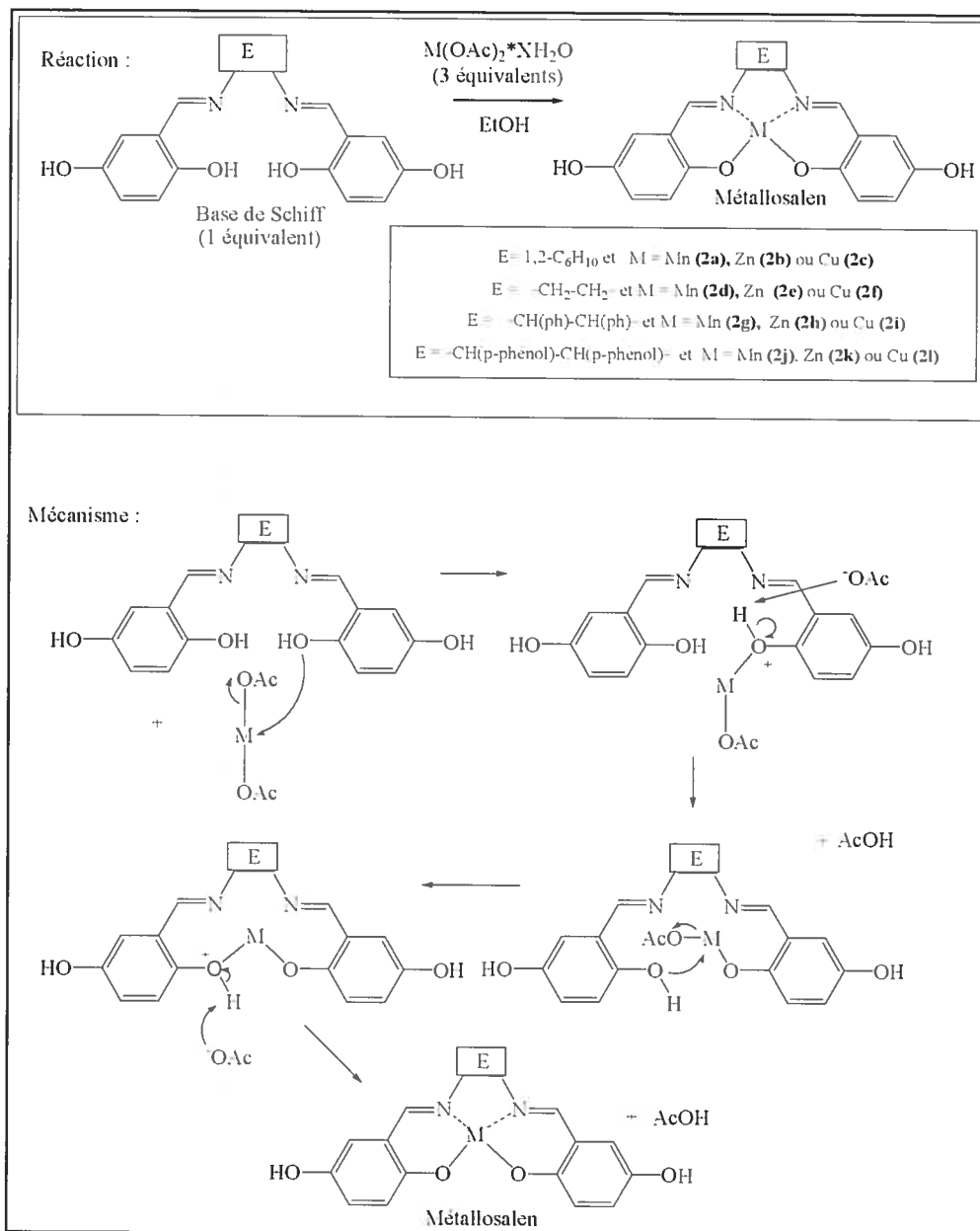
La caractérisation structurale par RMN, IR, spectre de masse et par l'analyse élémentaire confirme les structures. En effet, sur le spectre RMN-H, on observe la disparition du proton de la fonction aldéhyde (9.9 ppm) provenant du 2,5-dihydroxybenzaldéhyde et l'apparition d'un signal (8.5 ppm) correspondant au proton de l'imine ( $-\text{CH}=\text{N}-$ ) (**Figure 32, Page 87**). De plus, les protons amines (3.5 ppm) provenant des différentes diamines ont disparu. Selon les spectres IR, on observe la disparition des groupements amines et l'apparition des groupements alcools. Finalement, les pourcentages massiques du carbone, de l'hydrogène et de l'azote par l'analyse élémentaire sont en accord avec la structure proposée.



**Figure 32. Spectre RMN  $^1\text{H}$ ; (A) métallosalen 2b (DMSO- $\text{D}_6$ , présence d'acétone); (B) base de Schiff 1a (DMSO- $\text{D}_6$ , présence d'acétate d'éthyle); (C) trans-1,2-diaminocyclohexane (DMSO- $\text{D}_6$ ) et (D) 2,5-dihydroxybenzaldehyde ( $\text{CDCl}_3$ -TMS, présence d'acétate d'éthyle)**

### 2.3.1.2 Synthèse des complexes

Ces différentes bases de Schiff ont ensuite été complexées au zinc, au cuivre et au manganèse en s'inspirant du protocole de Jacobsen (**Figure 33, Page 89**).<sup>167</sup> La synthèse du complexe 2a (**Figure 33, Page 89**) avait été faite au préalable par Roula Chahwan. C'est encore une fois l'étape d'isolation qui a été modifiée. L'équipe de Jacobsen proposait d'effectuer la réaction en solution dans le toluène et l'éthanol. Après la réaction, une solution saturée en NaCl était ajoutée, suivie d'une extraction à l'aide de toluène. C'est par une étape finale de recristallisation dans un mélange heptane/dichlorométhane que le complexe était purifié. Étant donné que les salicylidènes que nous avons synthétisés sont peu solubles dans le toluène, la réaction s'est avérée plus efficace en présence d'éthanol seulement. L'ajout d'une solution de NaCl conduisant à la formation d'un complexe chloré a été enlevé du protocole par Roula Chahwan qui proposait pour sa part d'isoler le complexe en filtrant sous vide le milieu réactionnel, puis de l'extraire du solide restant en le solubilisant dans l'acétone. Comme aucun des métallosalens n'était soluble dans l'acétone, j'ai donc opté pour un lavage du milieu réactionnel avec de l'eau puis de l'acétone. Le rendement est alors passé de 60 à 95%.



**Figure 33. Mécanisme de formation des métallosalens**

En raison du caractère paramagnétique (**Figure 37, Page 96**) des complexes de Cu et de Mn, il a été impossible d'obtenir leurs spectres RMN. Les complexes diamagnétiques de Zn ont par contre permis de caractériser la structure de ces complexes métalliques. Étant



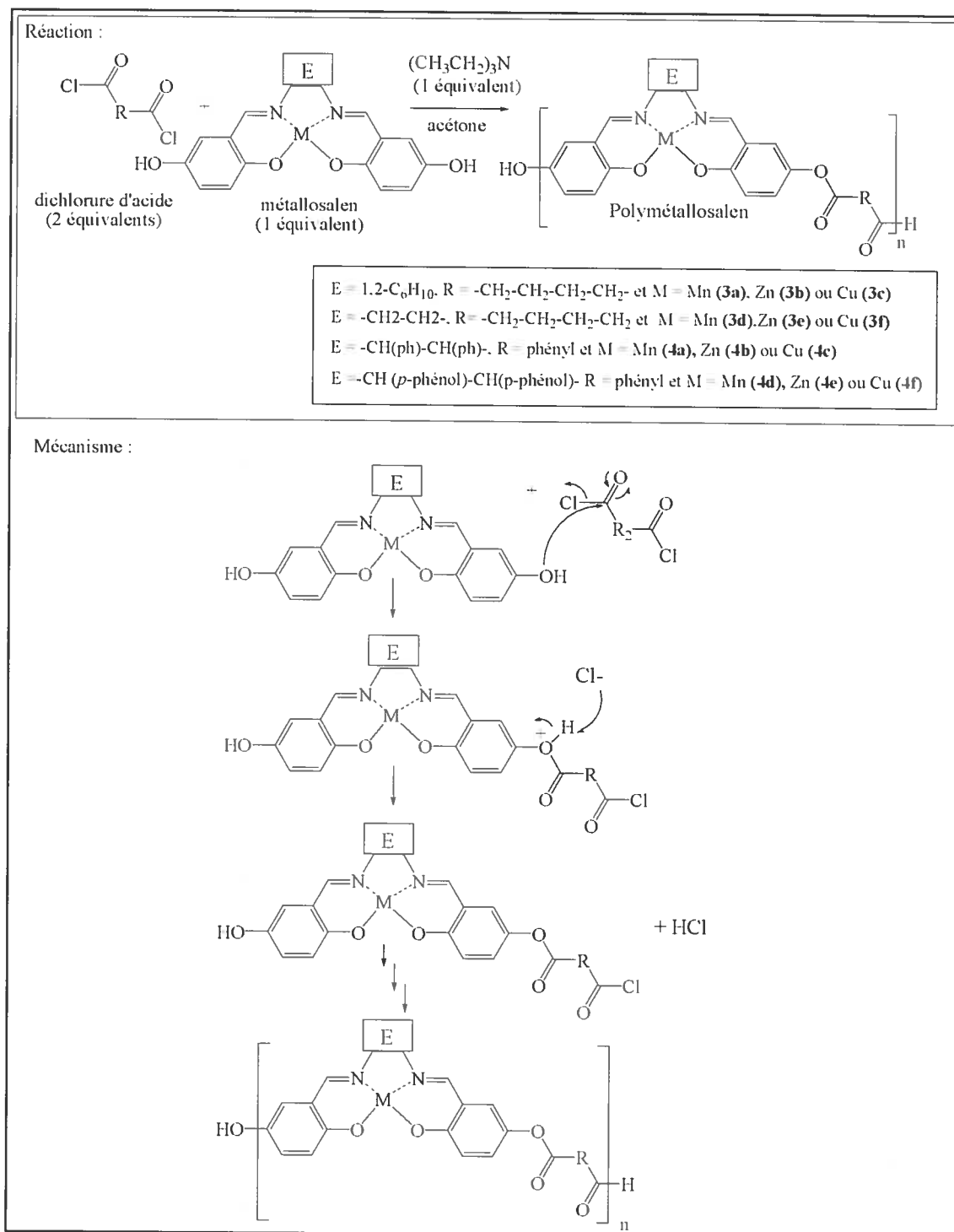
donné que les protons hydroxyles internes et externes des bases de Schiff apparaissent sous deux signaux différents en RMN- $^1\text{H}$ , il est possible de déterminer s'il y a véritablement eu complexation. Les résultats obtenus montrent bel et bien la disparition des protons hydroxyles internes (**Figure 32, Page 87**). La caractérisation IR n'amène pas de preuve structurale supplémentaire. Par contre, l'analyse élémentaire confirme l'addition de métal en diminuant l'importance massique du carbone, de l'hydrogène et de l'azote contenus dans la structure. Il est important de noter que certaines structures possèdent deux ou quatre molécules d'eau additionnelles, complexées à la structure (**Tableau 1**).

**Tableau 1. Analyse élémentaire des métalloalènes**

Métalloalènes (Figure 33. Page 89).	Analyse élémentaire calculée sans les molécules d'eau additionnelle (%)			Analyse élémentaire calculée avec les molécules d'eau additionnelle (%)			Analyse élémentaire trouvée (%)		
	C	H	N	C	H	N	C	H	N
<b>2a·2H<sub>2</sub>O</b>	59.0	4.9	6.9	54.0	5.4	6.4	55.6	5.2	5.7
<b>2b·2H<sub>2</sub>O</b>	56.5	4.8	6.7	53.0	5.3	6.2	55.6	5.2	5.7
<b>2c·4H<sub>2</sub>O</b>	57.8	4.8	6.7	49.2	5.7	5.7	49.1	5.4	5.4
<b>2d·2H<sub>2</sub>O</b>	54.4	4.0	7.9	49.4	4.6	7.2	49.2	4.2	6.6
<b>2e</b>	52.8	3.9	7.7				51.9	3.1	7.4
<b>2f</b>	53.1	3.9	7.7				50.2	3.3	6.9
<b>2g·2H<sub>2</sub>O</b>	66.5	4.4	5.5	62.1	4.8	5.1	60.5	4.8	6.0
<b>2h·4H<sub>2</sub>O</b>	65.2	4.3	5.4	57.2	4.7	4.8	56.2	3.7	4.3
<b>2i·2H<sub>2</sub>O</b>	65.4	4.3	5.4	61.1	4.7	5.1	59.1	4.8	5.7
<b>2j</b>	66.5	4.4	5.5				66.6	5.0	4.9
<b>2k·4H<sub>2</sub>O</b>	65.2	4.3	5.4	57.1	5.1	4.8	55.8	4.8	3.9
<b>2l</b>	65.4	4.3	5.4				64.9	4.6	5.4

### 2.3.1.3 Synthèse des polyesters

La polymérisation des métallosalens a été effectuée par estérification de différents diacides, en condition basique (**Figure 34, Page 92**). Roula Chahwan a mis au point la synthèse du polymère 3a. Après la réaction, elle évaporait le milieu réactionnel, puis effectuait une extraction à l'aide d'un mélange 80% DMF (diméthyl formamide)/eau. J'ai, par la suite, repris ce protocole, que j'ai appliqué aux différents complexes ainsi qu'aux différents diacides. Il s'est avéré que, dans certains cas, il est plus efficace d'évaporer le milieu réactionnel, puis de laver les résidus avec de l'eau suivie par de l'acétone. Les rendements obtenus avec cette nouvelle méthode varient de 30 à 90% pour les polyesters-*co*-adipoyles et de 25 à 99% pour les polyesters-*co*-téréphthaloyles.



**Figure 34. Mécanisme de formation des polymétallosalens linéaires**

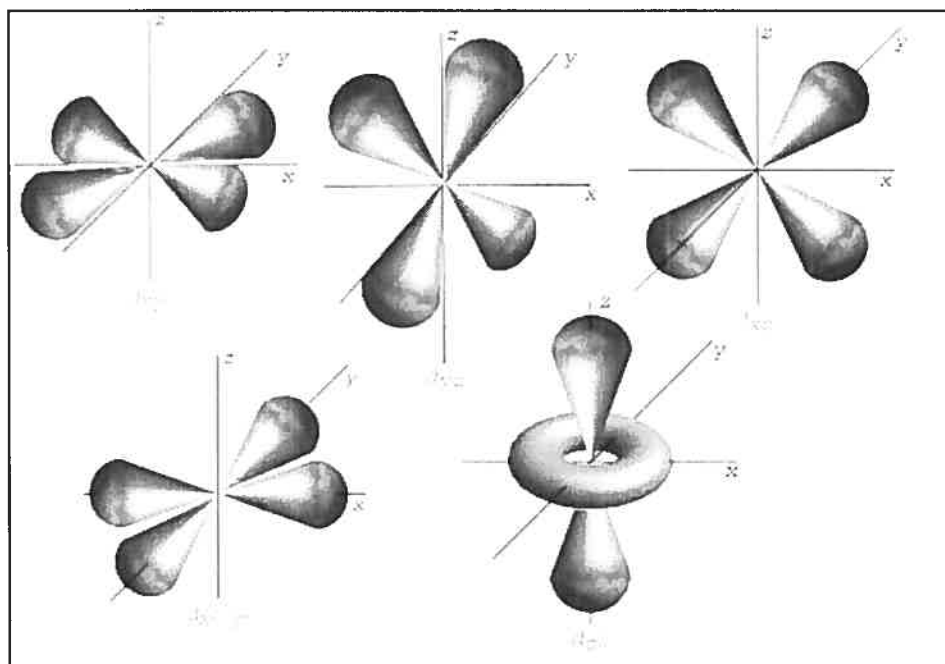
La RMN- $^1\text{H}$  des polyesters-*co*-alcanedioïques montre la disparition des protons hydroxyles présents sur les complexes. Les copolymères téréphtaliques n'ont pas été caractérisés en RMN à cause de leur faible solubilité. L'IR indique quant à lui la présence de nouvelles liaisons esters autant pour les polyesters-*co*-alcanedioïques que pour les polyesters-*co*-téréphtaliques. Les pourcentages massiques obtenus en analyse élémentaire confirment les structures proposées et indiquent que les polyesters 3b, 4a, 4c et 4d (**Figure 34, Page 92**) sont formés de complexe polyhydraté.

Les masses molaires des polymères 3a, 4c, 4d et 4f se sont avérées élevées (entre 31 000 et 58 000 g/mol). L'analyse par GPC des autres polymères linéaires *co*-aliphatiques et *co*-téréphtaliques n'a pu être réalisée avec succès en raison de leur faible solubilité en milieu organique probablement causée par leurs masses molaires élevées.

### 2.3.2 Théorie du champ cristallin

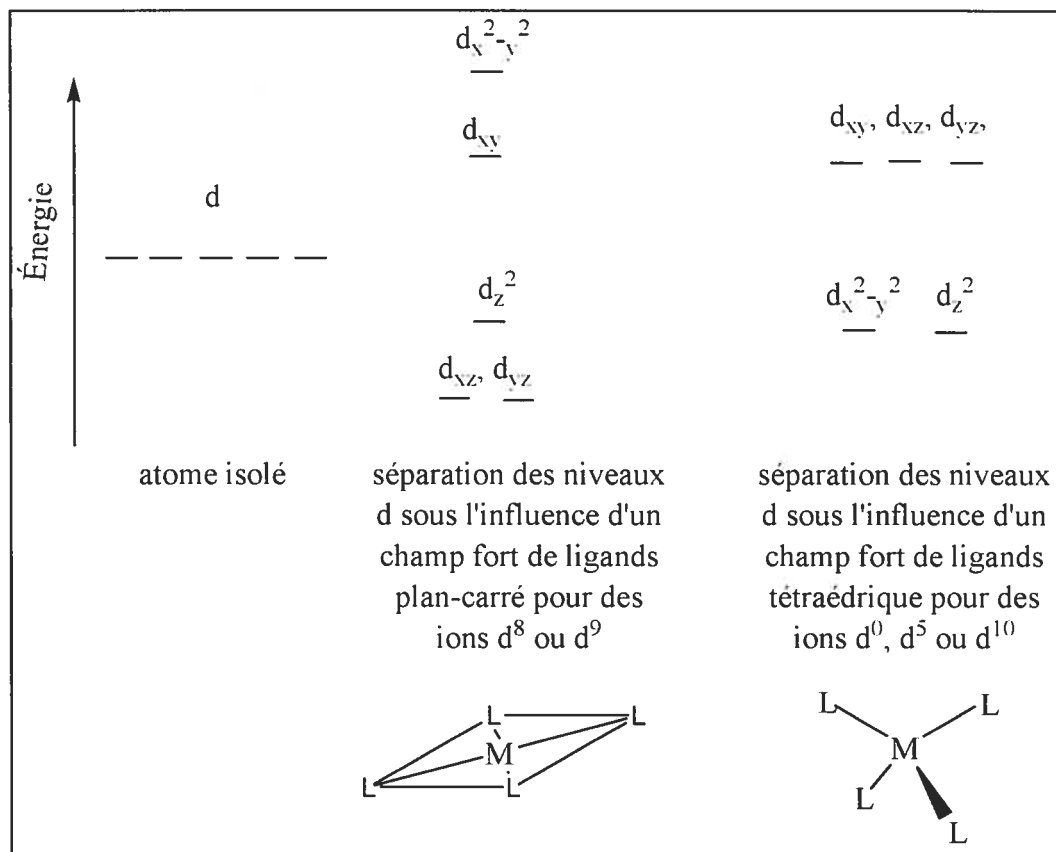
La liaison de coordination est formée par une paire d'électrons (doublet) provenant d'un ligand et d'une orbitale vide d'un élément de transition. La théorie du champ cristallin tient compte de l'influence du champ électrique des doublets d'électrons provenant des ligands sur les énergies des électrons d du métal coordonné.

Les orbitales axiales  $d_{x^2-y^2}$  et  $d_{z^2}$  ont leur lobe dirigé sur l'axe X, Y, et Z et forment le groupe d'orbitales  $d_\gamma$  (ou  $e_g$ ) tandis que les autres orbitales  $d_{xy}$ ,  $d_{xz}$ ,  $d_{yz}$  (appelées interaxiales) ont leur lobe orienté entre les axes (**Figure 35, Page 94**). Ils constituent le groupe  $d_\epsilon$  (ou  $t_{2g}$ ).



**Figure 35. Les 5 orbitales d** ([http://pt.wikipedia.org/wiki/Orbital\\_at%C3%B4mico](http://pt.wikipedia.org/wiki/Orbital_at%C3%B4mico))

Pour un atome ou un ion isolé (à l'état gazeux) les cinq orbitales d sont de même énergie, on les dit dégénérées. Par contre, à l'état solide ou en solution, ces orbitales sont soumises au champ électrostatique créé par les ions voisins ou les dipôles des molécules voisines. En d'autres termes, les orbitales d ne restent pas dégénérées lorsqu'elles sont en présence du champ électrostatique créé par les ligands (**Figure 36, Page 95**). Les orbitales dont les lobes sont dirigés dans la direction du ligand voient leur énergie augmenter (répulsion électrostatique). L'énergie des autres orbitales est diminuée. En conséquence, les orbitales de basse énergie sont préférentiellement occupées par les électrons d.

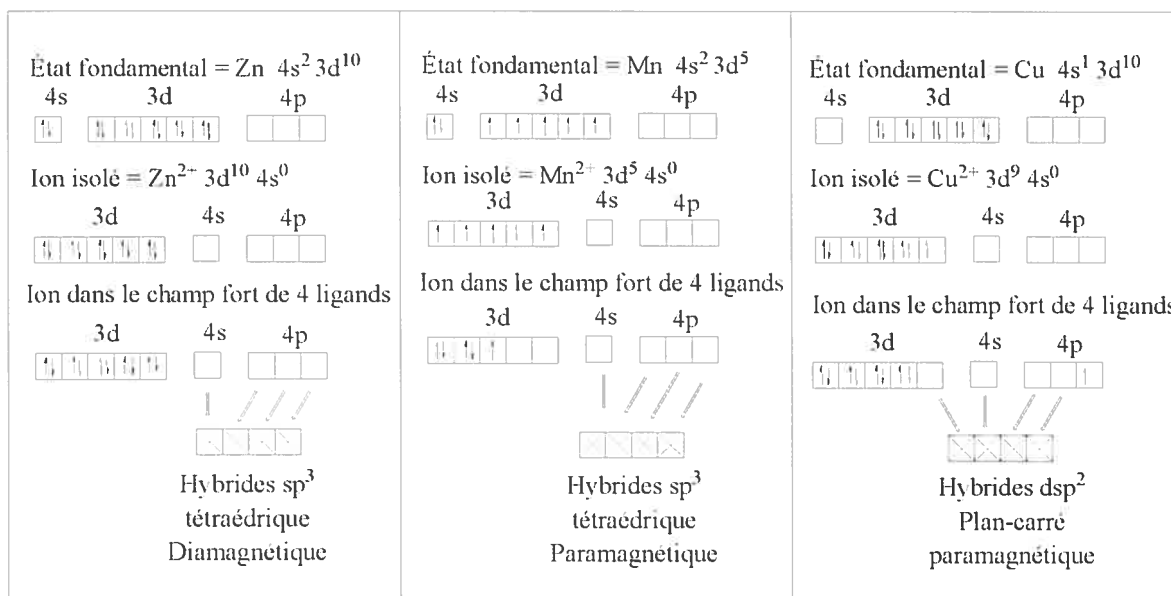


**Figure 36. Séparation des orbitales d sous l'influence d'un champ fort de ligands plan-carré ou tétraédrique**

On obtient des complexes de géométrie plan-carré lorsque 4 ligands axiaux se chélatent avec un ion métallique qui a la configuration  $d^8$  ( $d^8 s^0$ ) ou  $d^9$  ( $d^9 s^0$ ). Les complexes tétraédriques se forment préférentiellement (mais pas seulement) lorsque 4 ligands axiaux se chélatent à un ion métallique dont les orbitales  $d_e$  et  $d_\gamma$  sont occupées d'une manière symétrique (vide ( $d^0$ ), à moitié remplies ( $d^5$ ) ou pleines ( $d^{10}$ )).

En se basant sur la théorie du champ cristallin, il est possible de déterminer la géométrie des métallosalens synthétisés. En premier lieu, il faut déterminer le nombre d'électrons de valence du métal à l'état fondamental. Ensuite, le nombre d'électrons de

valence de l'ion isolé est déterminé en tenant compte de son degré d'oxydation. Enfin, considérant que la base de Schiff est un ligand à champ fort, les orbitales d se séparent sous l'action du champ électrostatique et les électrons se placent en premier dans les orbitales de plus faible énergie, puis dans les orbitales de plus forte énergie. Par exemple, à l'état fondamental, le zinc a douze électrons de valence disposés dans les orbitales ( $4s^2 3d^{10}$ ). Étant donné que celui-ci a un degré d'oxydation de +2, les dix électrons restants sont placés dans les orbitales en suivant la règle de Hund ( $3d^{10} 4s^0$ ). Finalement, l'action du champ fort du ligand tétraédrique produit la séparation des orbitales (**Figure 36, Page 95**) et les dix électrons de valence sont placés préférentiellement dans les orbitales de faible énergie. En conséquence, les métallosalens à base de zinc(II) ont une structure tridimensionnelle tétraédrique de même que les métallosalens à base de manganèse(II) tandis que les métallosalens à base de cuivre(II) ont une géométrie plan-carré (**Figure 37**).

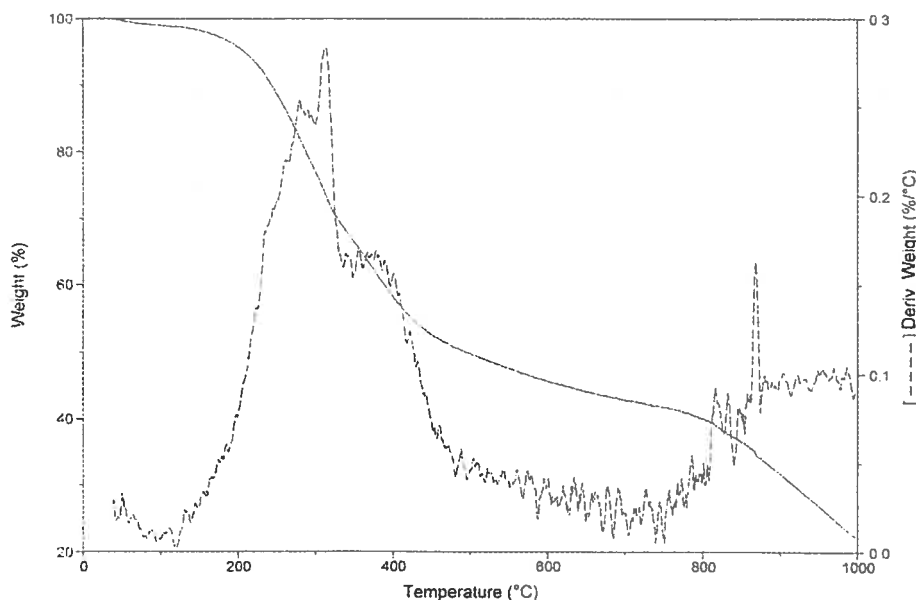


**Figure 37. Détermination de la structure tridimensionnelle des métallosalens à base de cuivre, de manganèse et de zinc**

### 2.3.3 Études thermiques, cristallinité et hydrophobicité des polyesters

L'analyse thermique des polyesters par DSC indique une  $T_g$  élevée de  $150 \pm 10$  °C. L'analyse thermogravimétrique (**Figure 38**) semble confirmer la stabilité thermique des polyesters avec des températures de décomposition allant de 200 °C à 1000 °C. De plus, un signal correspondant à la présence d'eau permettant l'hydrolyse des liaisons esters est observé sur le graphique de décomposition thermique. En effet, une faible chute de poids vers 100 °C est observée ce qui confirme la présence d'eau chélatée aux centres métalliques. L'analyse thermogravimétrique démontre qu'il y a décomposition du monomère adipoyl ou téréphtaloyl (200-300 °C) suivie de la décomposition du monomère complexé (800-1000 °C).

Le point de fusion augmente après la complexation de la base de Schiff passant de 200 °C à 223 °C et plus. Ces résultats démontrent que l'étape de complexation stabilise le système.



**Figure 38.** Analyse thermogravimétrique du polymère linéaire 4c



Le caractère semi-cristallin de ces polyesters a été confirmé à l'aide du microscope polarisant ainsi que de l'AFM et leur caractère hydrophobe a été démontré par l'analyse de l'angle de contact. De plus, de tels polyesters vont favoriser l'adhésion cellulaire puisque l'angle de contact d'une goutte d'eau sur ceux-ci est d'environ 40 à 50°.<sup>168,169</sup>

### 2.3.4 Étude de la conductivité

L'étude de la conductivité des polyesters semble indiquer que les polyesters-*co*-téréphtaloyle possèdent une meilleure capacité à conduire l'électricité que les polyesters-*co*-adipoyles. Il ne semble pas y avoir de variation importante en ce qui concerne la nature métallique du complexe. De plus, la conductivité des polyesters ne semble pas régie par le caractère cristallin ni par la variation de la masse molaire (**Article 1, Table 2, Page 77**). Toutefois, la majorité des polymères analysés ont démontré une conductivité inférieure à  $10^{-8}$  S/cm et sont donc des matériaux isolants. Seulement trois polymères (**polymères 4a, 4d et 4f, Article 1, Table 2, Page 77**) ont obtenus une conductivité légèrement supérieure et propre aux matériaux semi-conducteurs avec une conductivité se situant entre  $10^{-7}$  et  $10^{-1}$  S/cm.

### 2.3.5 Cytotoxicités

L'étude de la cytotoxicité des polyesters ainsi que des produits de dégradation a été effectuée. Les analyses MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) et LDH (lactate déshydrogénase) (**Article 1, Figure 6 et 7, Page 78-79**) démontrent que les polyesters 4a, 4d et 4f ainsi que leurs produits de dégradation (métallosalens 2g, 2j, 2l et l'acide téréphtalique) ne sont pas toxiques aux concentrations inférieures à 0.1 mg/mL (limite de toxicité). Les métallosalens 2j, 2l ne sont pas toxiques; toutefois, le métallosalen 2g est toxique aux concentrations supérieures à 0.1 mg/mL.

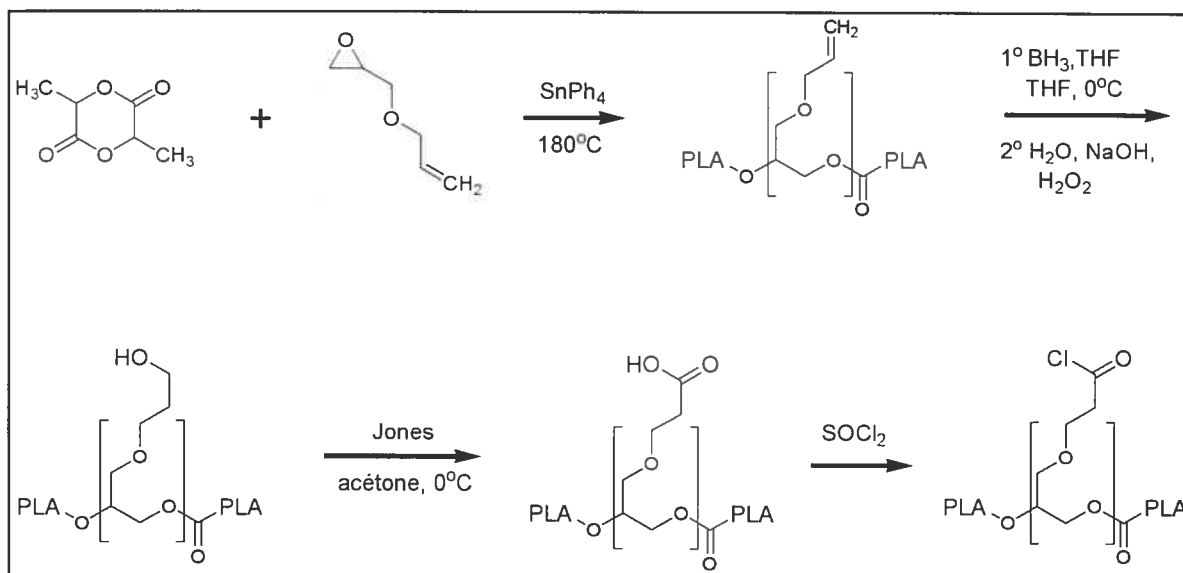
## 2.4 Résultats complémentaires

Certaines données n'ont pas été traitées dans l'article 1 afin de ne pas le surcharger. La section suivante regroupe donc des résultats complémentaires, soit la synthèse de polymères réticulés ainsi que le dosage des métaux par l'absorption atomique.

### 2.4.1 Polymères réticulés

La synthèse de polymères réticulés conducteurs à base de (DL)-PLA et de 1% de métallosalens a été réalisée. La structure réticulée de ces PLA devrait augmenter le transport de charge interchaîne et interdomaine. De plus, cette structure permet une grande délocalisation de charge tout au long de la chaîne polymérique.

Les étapes de synthèse de la structure polymérique à base de (DL)-PLA sont décrites dans l'article 2. La synthèse du (DL)-PLA-SM réticulée s'effectue par la réaction, à la température de fusion, du (DL)-dilactide et du 1,2-époxy-3-allyloxypropane, en présence d'une quantité catalytique de tétraphényle étain ( $\text{SnPh}_4$ ). Par la suite, le polymère subit une réaction d'hydroboration-oxydation pour conduire à l'alcool correspondant qui est ensuite oxydé à l'aide du réactif de Jones en son dérivé acide carboxylique (**Figure 39, Page 100**). Ce dernier, par réaction avec le chlorure de thionyle, conduit à l'intermédiaire chlorure d'acide sur lequel est greffé une autre molécule tel qu'un métallosalen.



**Figure 39. Synthèse du (DL)-PLA**

Tous les salens complexés de l'article 1 (**Figure 33, page 89**) ont servi à réticuler le (DL)-PLA par estérification (**Figure 40, page 101**). Ces polymères réticulés ont finalement été caractérisés à l'aide de l'IR, du RMN- $^1\text{H}$ , du RMN- $^{13}\text{C}$  et de l'analyse élémentaire. Les résultats de ces analyses structurales sont identiques aux résultats obtenus pour les polymères PLA-SM greffés (**Article 3, Page 147**).

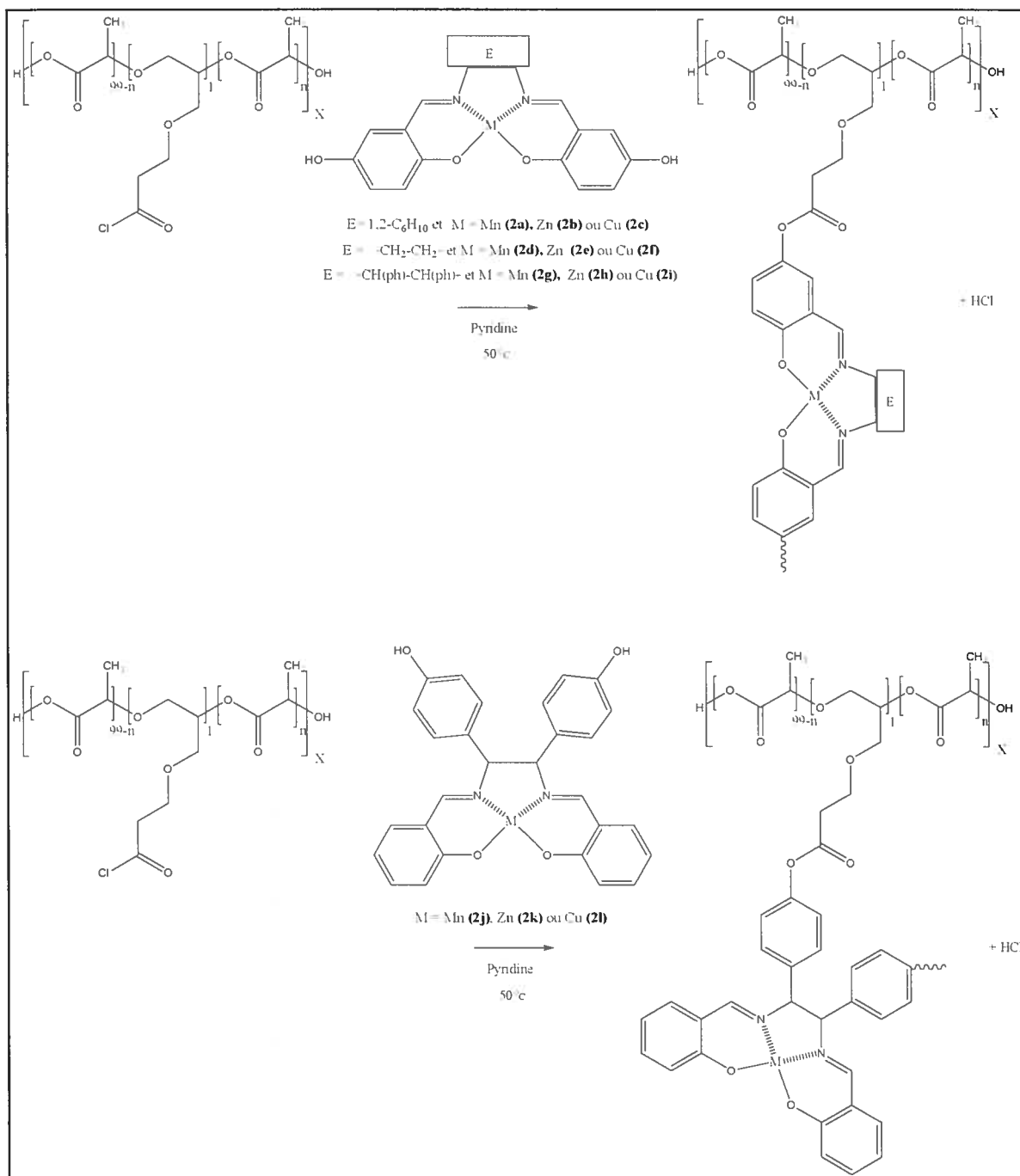


Figure 40. Synthèses des polymères réticulés

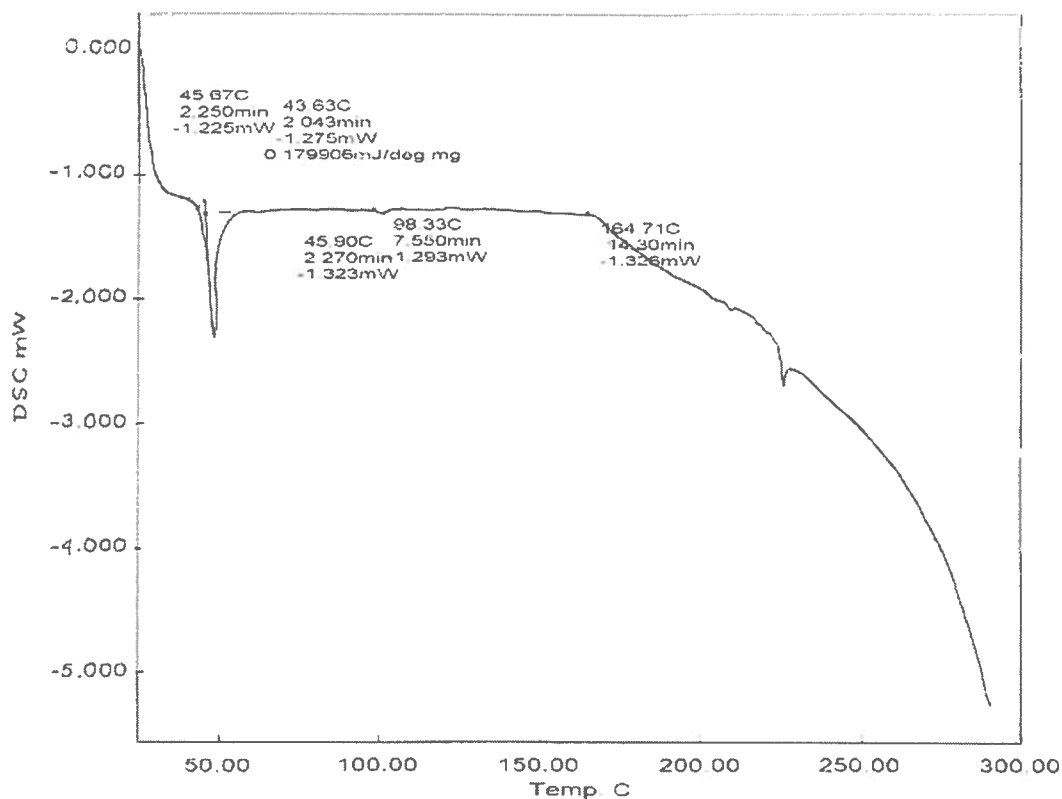
Le tableau qui suit indique les masses molaires obtenues par chromatographie à perméation de gel (GPC) pour les (DL)-PLA-SM réticulés. La distribution étroite de la masse molaire indique que la polymérisation est bien contrôlée. L'échantillon (DL)-PLA-2l, avec une polydispersité de 2.32 n'a probablement pas été réticulé complètement indiquant ainsi l'apparition de deux familles de polymères : avec ou sans réticulation.

**Tableau 2. Distribution des masses molaires des PLA-SM réticulés**

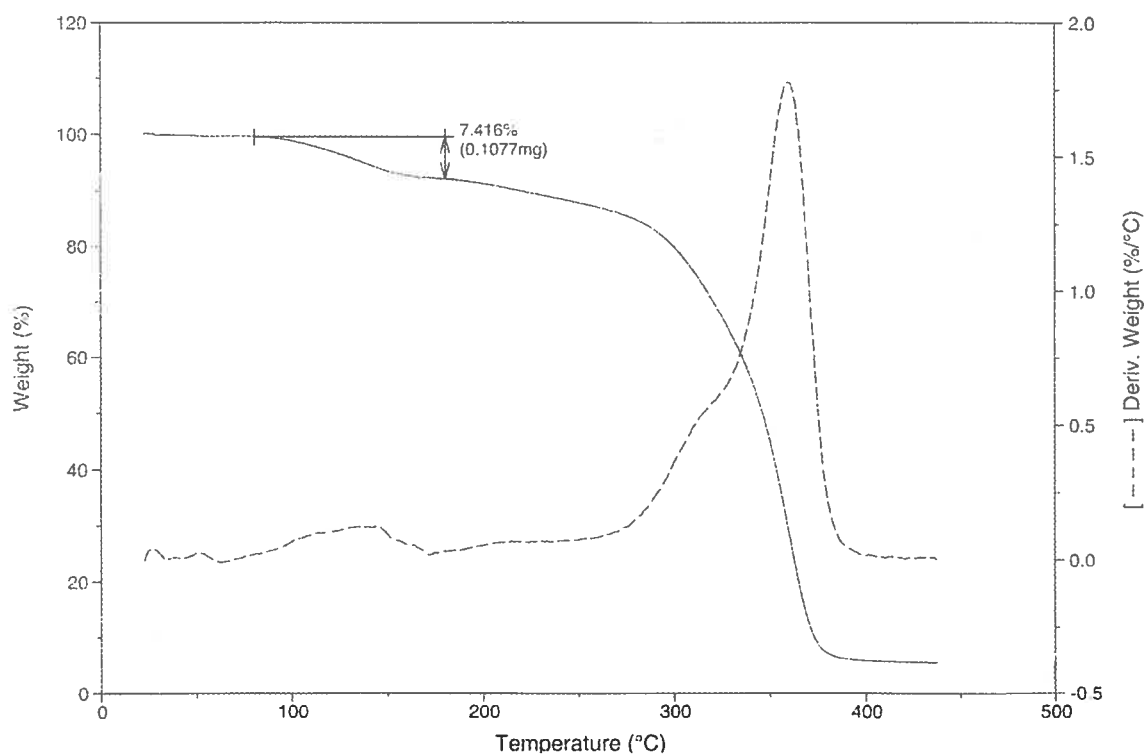
<b>Échantillon PLA-(SM) réticulé (Figure 40, Page 101)</b>	<b><math>M_n</math> (masse molaire en nombre) g/mol</b>	<b><math>M_p</math> (masse molaire en poids) g/mol</b>	<b><math>P</math> (polydispersité)</b>
PLA-2a réticulé	9100	14100	1.55
PLA-2b réticulé	9300	16300	1.74
PLA-2c réticulé	9900	17700	1.79
PLA-2d réticulé	4100	6400	1.54
PLA-2e réticulé	4700	7400	1.58
PLA-2f réticulé	3000	3900	1.32
PLA-2g réticulé	3900	5700	1.47
PLA-2h réticulé	4700	8000	1.71
PLA-2i réticulé	3200	4300	1.36
PLA-2j réticulé	3300	4600	1.40
PLA-2k réticulé	13900	18900	1.36
PLA-2l réticulé	6600	15400	2.32

L'analyse enthalpique différentielle (DSC) des polymères réticulés indique une température de transition vitreuse ( $T_g$ ) variant de 43 à 52°C (**Figure 41, Page 103**). Le graphique de la dégradation des (DL)-PLA-SM en fonction de la température (**Figure 42, Page 104**) indique la présence d'eau. Cette eau semble permettre l'hydrolyse en bout de chaîne du (DL)-PLA vers 100-150°C. La dégradation de l'entité polymérique du (DL)-PLA

s'effectue seulement entre 275-375°C. On ne voit pas la dégradation des complexes métalliques sur la figure 42 puisque l'analyse thermogravimétrique s'arrête à 450°C. Par contre, l'étude thermogravimétrique des polymères linéaires indique que la dégradation des complexes s'effectue entre 800-1000°C (**Figure 38, Page 97**).

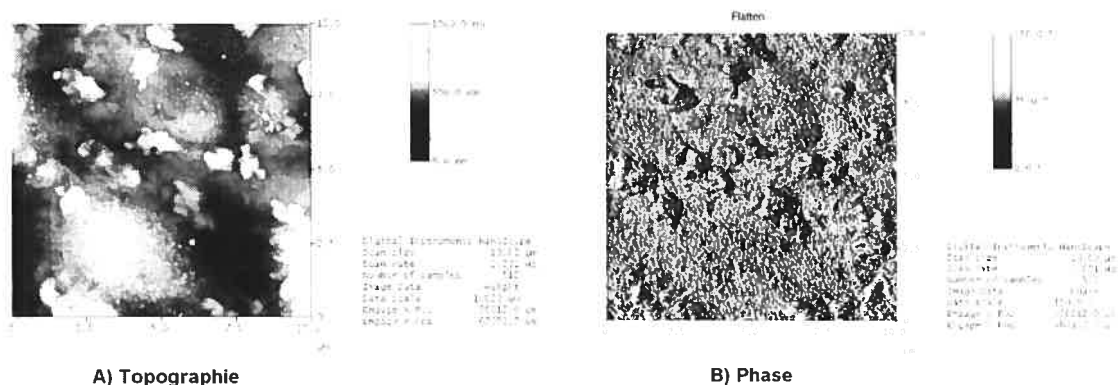


**Figure 41. Analyse enthalpique différentielle du PLA-21**



**Figure 42. Analyse thermogravimétrique du PLA-2I**

L'analyse de surface à l'aide de microscope à force atomique (AFM) et du microscope polarisant démontre le caractère semi-cristallin des (DL)-PLA-SM réticulés (**Figure 43, Page 105**). De plus, la mesure de l'angle de contact obtenu en déposant une goutte d'eau sur leur surface révèle leur caractère hydrophobe (angle de contact d'environ  $75^\circ$ ).



**Figure 43. Image AFM du PLA-2l réticulé.**

Ces structures ont montré de façon générale une faible tendance à conduire l'électricité (conductivité  $< 10^{-8}$  S/cm, **Tableau 3, Page 106**) probablement causée par la faible teneur en SM (1%). À l'intérieur de ces structures réticulées, la délocalisation électronique intrachaine peut s'effectuer sur une longue distance, ce qui a pour effet de diminuer les interactions interchaîne et interdomaine. L'augmentation de la teneur en métallosalens permettrait d'augmenter le taux de réticulation et diminuerait la délocalisation intramoléculaire et augmenterait la délocalisation interchaîne et interdomaine conduisant probablement en une conductivité plus élevée. Un seul échantillon montre une propriété conductrice supérieure : il s'agit du (DL)-PLA-2l. Il est intéressant de noter que le polymère linéaire *co*-téréphtalique 4f (**Figure 34, Page 92**), composé du même métallosalén (2l, **Figure 33, Page 89**), semble lui aussi avoir une conductivité supérieure aux autres.



**Tableau 3. Conductivité des PLA-SM réticulés.**

<b>Nom de l'échantillon PLA-(SM) réticulé (Figure 40, page 101 )</b>	<b>Conductivité (S/cm)</b>
PLA-2a réticulé	1.4 E-9
PLA-2b réticulé	3.6 E-08
PLA-2c réticulé	5.8 E-10
PLA-2d réticulé	8.8 E-10
PLA-2e réticulé	1.2 E-9
PLA-2f réticulé	7.4 E-10
PLA-2g réticulé	1.3 E-9
PLA-2h réticulé	1.5 E-9
PLA-2i réticulé	6.0 E-9
PLA-2j réticulé	1.2 E-9
PLA-2k réticulé	6.2 E-10
PLA-2l réticulé	4.0 E-6

### 2.4.2 Absorption atomique

Pour doser la concentration de métaux présente à l'intérieur des polymères, la méthode spectroscopique d'absorption atomique (AA) a été utilisée (**Figure 44, Page 107**). Cette méthode est simple, rapide et très sélective.

La solution à doser est vaporisée dans une flamme produite par un nébulisateur pneumatique qui convertit l'échantillon en vapeur atomique. Sa température doit être suffisamment élevée pour dissocier les molécules du composé qui sont ainsi réduites en atomes. Il y a deux types de flammes soit acétylène/air (2300°C), soit une flamme cétylène/oxyde nitreux (2900°C). En AA, une lampe à cathode creuse excite les atomes présents dans la flamme en les irradiant avec une radiation lumineuse caractéristique de

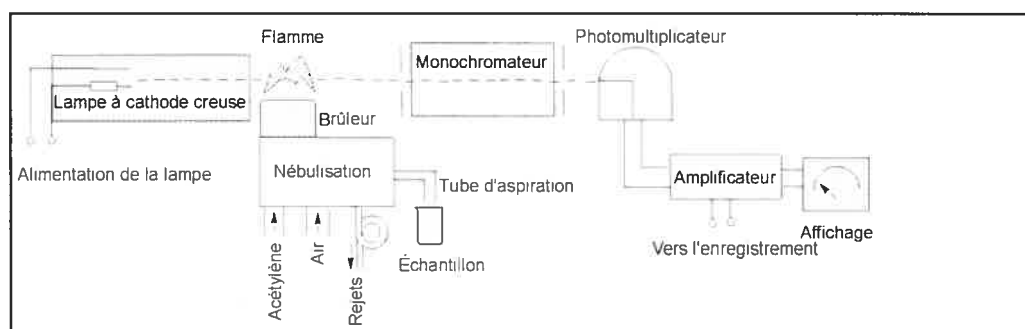
l'élément à doser. L'échantillon absorbe alors une partie de cette radiation. Le monochromateur disperse la lumière et isole la longueur d'onde spécifique à l'élément qui passe jusqu'au détecteur. Le détecteur est un photomultiplicateur où l'intensité de la lumière est amplifiée et ensuite mesurée. Finalement, après le traitement par ordinateur, on obtient l'absorbance de l'échantillon. La quantité d'énergie absorbée ( $A$ ) suit une loi analogue à la loi de Beer Lambert ( $A = \log I_0/I = KC$ ) où  $C$  est la concentration et  $K$  est une constante proportionnelle à la longueur du chemin optique. Elle dépend aussi de la nature de l'espèce absorbante. La sensibilité ( $S$ ) de la méthode est définie comme étant la pente de la courbe absorbance-concentration. La limite de détection ( $LD$ ) représente la plus petite concentration d'analyte qui puisse être détectée avec une bonne certitude.

$$LD = 3 \times S_b / S \quad (4)$$

$S_b$  est l'écart-type sur le signal du blanc. La précision du dosage représente l'évaluation de la dispersion des résultats d'analyse due aux erreurs aléatoires. On utilise la distribution de Student dépendant du nombre de mesures effectuées. La relation (5) permet d'obtenir la précision :

$$P(95\%) = t \times S_b \quad (5)$$

Où  $t$  est le facteur de Student dépendant du nombre de mesures.



**Figure 44. L'appareil d'absorption atomique**

Les quatre polymères les plus conducteurs 4a, 4d, 4f et le polymère réticulé PLA-2l, ont été analysés à l'aide de l'absorption atomique afin de connaître leur teneur métallique. Les résultats obtenus sont relativement près des valeurs théoriques prévues (**Tableau 4, Page 108**). Par contre, ils ne sont pas inclus dans le P(95%). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cet écart. Premièrement, on peut remettre en question la pureté des métallosalens. Une faible proportion de base de Schiff peut être présente à titre d'impureté dans l'échantillon ce qui conduit à une structure polymérique avec une teneur en métal légèrement plus faible que prévu. Il est aussi possible que l'échantillon PLA-2l possède une quantité inférieure à 1% d'embranchement latérale ou alors, que l'étape finale d'estérification (réticulation) ne possède pas un rendement de 100%. Pour répondre à ce problème, on y dosera le nombre d'embranchements présents sur la chaîne de PLA.

**Tableau 4. Dosage par absorption atomique des métaux présents sur les polymères**

Polymère (Figure 34 et Figure 40, Page 92 et 101)	Longueur d'onde (nm), Type de flamme	Pourcentage massique théorique de métal (%)	Pourcentage massique expérimental de métal (%) et P(95%)
4a	279.5 (Air-acétylène)	Mn = 8.66	Mn = 8.05 ± 0.04
4d	279.5 (Air-acétylène)	Mn = 8.66	Mn = 8.20 ± 0.04
4f	324.8 (Air-acétylène)	Cu = 9.88	Cu = 9.67 ± 0.02
PLA-2l	324.8 (Air-acétylène)	Cu = 0.867	Cu = 0.814 ± 0.003

La sensibilité obtenue pour le dosage du Mn est de 0.112 mg/L et celle du Cu est de 0.064 mg/L et représente la pente du graphique de la courbe d'absorption en fonction de la concentration ( $y_{(Mn)} = 0.003 + 0.112X$  et  $y_{(Cu)} = 0.0001 + 0.064X$ ). La limite de détection du Mn est de 0.03 mg/L et celle du Cu est de 0.09 mg/L.

### 2.4.3 Cytotoxicité

Même si l'analyse MTT du (DL)-PLA-acide a démontré une faible toxicité aux concentrations supérieures à 1mg/mL (**Figure 45, Page 109**), le polymère réticulé (DL)-PLA-2l ne semble pas toxique. Par contre, l'analyse LDH n'indique aucune toxicité pour le (DL)-PLA-2l, le (DL)-PLA-acide ainsi que le complexe 2l. La toxicité du (DL)-PLA-acide est probablement très faible aux concentrations supérieures à 1mg/mL puisque l'analyse LDH ne la détecte pas. Cette étude préliminaire *in vitro* de la cytotoxicité confirme donc la biocompatibilité de ces polymères réticulés.

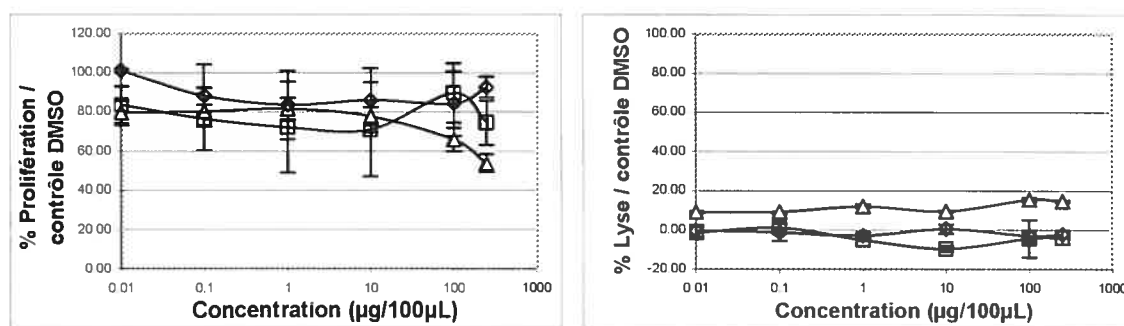


Figure 45. Résultats de la MTT et LDH des polymères réticulés.

(DL)-PLA-acide (Δ), 2l (□) et (DL)-PLA-2l (◇)

## 2.5 Conclusion

L'objectif de cette section était de synthétiser de nouveaux polymères chargés, biodégradables et biocompatibles afin d'être utilisés en régénération tissulaire. Les polymères synthétisés sont constitués de salicylidènes complexés et d'acide téréphthalique ou d'alcane dioïque. Les métalloalènes ont aussi été utilisés pour réticuler une chaîne polymérique constituée de PLA. Après certaines modifications, les trois étapes de synthèse nécessaires à l'élaboration des polymères linéaires se sont avérées simples, rapides et reproductibles. Il en est de même pour la synthèse des (DL)-PLA-SM réticulés.

L'analyse structurale a été effectuée à l'aide de la RMN- $^1\text{H}$ , de la RMN- $^{13}\text{C}$ , de l'IR, du spectre de masse, de l'analyse élémentaire et de la chromatographie par perméation de gel. L'absorption atomique a permis le dosage des métaux présents dans chacun des polymères. L'analyse physicochimique révèle le caractère semi-cristallin, hydrophobe et la stabilité thermique de ces différents polymères. De plus, leur non-toxicité nous permet d'envisager sérieusement des applications biologiques en régénération tissulaire. Finalement, le caractère conducteur de certains de ces polymères a été démontré.

### **Chapitre 3. Copolymères greffés en thérapie génique : Conception d'une structure polymérique greffée**

*«L'esprit scientifique nous interdit d'avoir une opinion sur des questions que nous ne comprenons pas, sur des questions que nous ne savons pas formuler clairement. Avant tout, il faut savoir poser des problèmes. Et quoi qu'on dise, dans la vie scientifique, les problèmes ne se posent pas d'eux-mêmes. C'est précisément ce sens du problème qui donne la marque du véritable esprit scientifique. Pour un esprit scientifique, toute connaissance est une réponse à une question. S'il n'y a pas eu de question, il ne peut y avoir connaissance scientifique. Rien ne va de soi. Rien n'est donné. Tout est construit. »*

***Gaston Bachelard, La formation de l'esprit scientifique, 1938***

### **3.1 Article 2: Synthesis of new versatile functionalized polyesters for biomedical applications**

Véronique Nadeau, Grégoire Leclair, Shilpa Sant, Jean-Michel Rabanel, Richard Quesnel,  
Patrice Hildgen \*

\* Laboratoire de nanotechnologie pharmaceutique, Faculté de pharmacie, Université de Montréal, CP 6128, succursale Centre Ville, Montréal (Québec), Canada H3C 3J7

Received 12 May 2005; received in revised form 16 September 2005; accepted 22 September 2005

Available online 24 October 2005

#### **3.1.1 Abstract**

A new family of branched polymers was synthesized for different biomedical applications such as the preparation of targeted nanoparticulate drug carriers. They are new copolymers of hydroxy-acids and allyl glycidyl ether. The functional groups (allyl-, hydroxyl- and carboxyl-) to which various groups are grafted are linked to the polymer backbone. The resulting polymers were characterized by  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, size exclusion chromatography (SEC), elemental analysis and differential scanning calorimetry (DSC). In vitro cytotoxicity assays were also conducted to ensure biocompatibility of the polymers. In order to obtain some structural evidence, different molecules have been grafted on the pendant groups. The method allows a rapid and easy synthesis of allyl-, hydroxyl- and carboxyl-branched degradable polymers for grafting various bioactive molecules.

**KEYWORDS;** Branched polymer; Biocompatible; Bioadhesive

### 3.1.2 Introduction :

Biodegradable polymers have had a remarkable impact in the field of controlled drug delivery. Over the past two decades, poly-(L-lactic acid) (PLLA) and its copolymers with D-lactic acid or glycolic acid or  $\epsilon$ -caprolactone (CL) or polyethylene glycol (PEG) have been extensively studied as controlled drug delivery carriers. Such carriers offer various advantages such as controlled drug release rate, improved therapeutic efficiency, prolonged biological activity and decreased administration frequency.<sup>1</sup> With the in-depth understanding of the pathophysiology and cellular mechanisms of the disease, targeted or cell specific drug delivery is the focus of the current research. Block and graft copolymers of PLA and PEG have opened new avenues to the field of targeted drug delivery by prolonging the circulation time of the polymeric colloidal drug carriers. To target specific cell type in the body (as in case of tumour cells), the presence of specific ligands is necessary on the surface of the colloidal carriers. This would reduce the systemic side effects of the drug by improving the receptormediated uptake by the targeted cells. For instance, targeted doxorubicin delivery could be achieved by folate conjugated mixed micelles of the PLGA-*b*-PEG-folate polymer.<sup>2</sup> In other words, targeted drug delivery has generated a great need for biomaterials with bioadhesive and/or specific recognition properties. Thus, the ability to impart bioadhesivity, cell specificity or other specific characteristics to the existing biocompatible polymers represents an important synthetic challenge as well as holds the promise for better therapeutic protocols. Indeed, the availability of functional pendant groups is highly desirable for the fine tuning of the above-mentioned properties. Various efforts are directed towards achieving this goal.<sup>3,4</sup> However, chemistry involved in the synthesis of the functional monomers is complex and/or tedious, whereas the subsequent polymerization is generally out of control. For example, Bizzarri et al. have synthesized functionalized malolactonate polymers and copolymers, where the synthesis of monomers itself was long with low yields (12–45%) and polymerization reactions were very slow (over 4–30 days).<sup>3</sup> Similarly, Ouchi et al. have



reported the synthesis of PLAgrafted polysaccharides, however, their method required protection/deprotection steps.<sup>5</sup> Thus, there are very few reports on the efficient and easy synthesis of functionalized polyesters. Amongst them, Finne et al. have reported very efficient synthesis method for functionalized PCL and PLLA with controlled molecular weight and low polydispersity.<sup>6</sup>

The purpose of this paper is to develop a high yield and rapid synthesis method for grafted PLA, PCL and polyglycidine with allyl, hydroxy and carboxylic pendant functional groups. These are versatile copolymers of polyesters and allyl glycidyl ether. These polymers have been developed for grafting various bioactive molecules like salens<sup>7</sup> or ligands for E-selectin and for P-glycoprotein. Also, Methoxy PEG-g-PLA has been successfully used to prepare colloidal nanoparticles for sustained drug release.<sup>8</sup>

### 3.1.3 Experimental Section

**1. General.** All materials (reagents and solvents) were purchased from Laboratoire MAT (Montréal, Canada) and Sigma-Aldrich (St-Louis, USA) and used without further purification. The polymers were characterized by <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR (Brüker ARX 400 MHz spectrometer at Centre Regional de RMN) using tetramethylsilane (TMS) as internal standard in CDCl<sub>3</sub> or DMSO-D<sub>6</sub> by IR-FTIR (Perkin-Elmer spectrometer), by SEC (Water SEC coupled with refractive index detector) using THF or chloroform as mobile phase and polystyrene as standards and by measurement of melting point (electrothermal apparatus). Elemental analysis were performed by the Laboratoire d'Analyse Élémentaire of the Université de Montréal with a Fisons Instrument, model EA 1108 CHN.

**2. Cytocompatibility studies; Cell lines.** RAW 262.7 and J774A.1 murine macrophage cell lines (American Type Culture Collection, Rockville, USA) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, USA) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Gibco, USA) and penicillin/streptomycin (Gibco, USA). The cells

were grown and maintained in tissue culture flasks and incubated at 37 °C in a 5% carbon dioxide atmosphere.

**Proliferation assays.** Polymers dissolved in 10 µl dimethyl sulfoxide (DMSO) were added in a 96 well flat-bottomed microplate (Corning, NY, USA), in triplicate. The amounts tested were: 250, 100, 10, 1, 0.1, and 0.01 µg. DMSO was subsequently removed under vacuum. RAW 264.7 or J774A.1 cells were diluted in complete medium at a final concentration of  $5 \times 10^5$  cells/ml and plated (100 µl/well). The plates were incubated for 24 h after which cell proliferation was assessed with MTT assay.<sup>9</sup> Briefly, 10 ml of thiazolyl blue tetrazolium bromide (5 mg/ml) dissolved in PBS (10 µM, pH 7.4) and filtered on 0.22 µm sterile filter (Millipore, Bedford NMA, USA), was added to each well. After 3 h of incubation time at 37 °C in 5% carbon dioxide atmosphere, 50 ml of a solubilization solution (isopropanol, 10% Triton 100X, 0.1 N HCl) was added to each well to dissolve the dark blue formazan crystals. Absorbance was read at 570 nm on a microplate reader (SAFIRE, Tecan, Austria).

**Lysis assays.** The presence of lactate dehydrogenase (LDH) in the supernatant obtained from proliferation assays was used as an indicator of cell lysis and death and determined using a commercial dosing kit (Sigma, St-Louis, MO, USA) used as directed by the manufacturer. Briefly, 5 µl of supernatant (taken up after the 24 h incubation time) were transferred to a new 96 well microplate and incubated with the reaction mixture for 30 min. The reaction was stopped with 0.1 N HCl. Microplates were read by using a microplate reader (SAFIRE, Tecan, Austria), at the wavelength of 450 nm (reference wavelength at 690 nm). Results were plotted in reference to positive control wells with 100% lysed cells.

**3. Synthesis of PLA with 1% allyl pendant group (1).** To remove all trace of water from the reagents, dilactide (21.5 g, 149 mmol) and tetraphenyltin (7.7 mg, 0.02 mmol) were dissolved in toluene and then solvent was removed by rotary evaporation. The reagents were dried under vacuum in the reaction flask. The allyl glycidyl ether (0.36 mL, 3

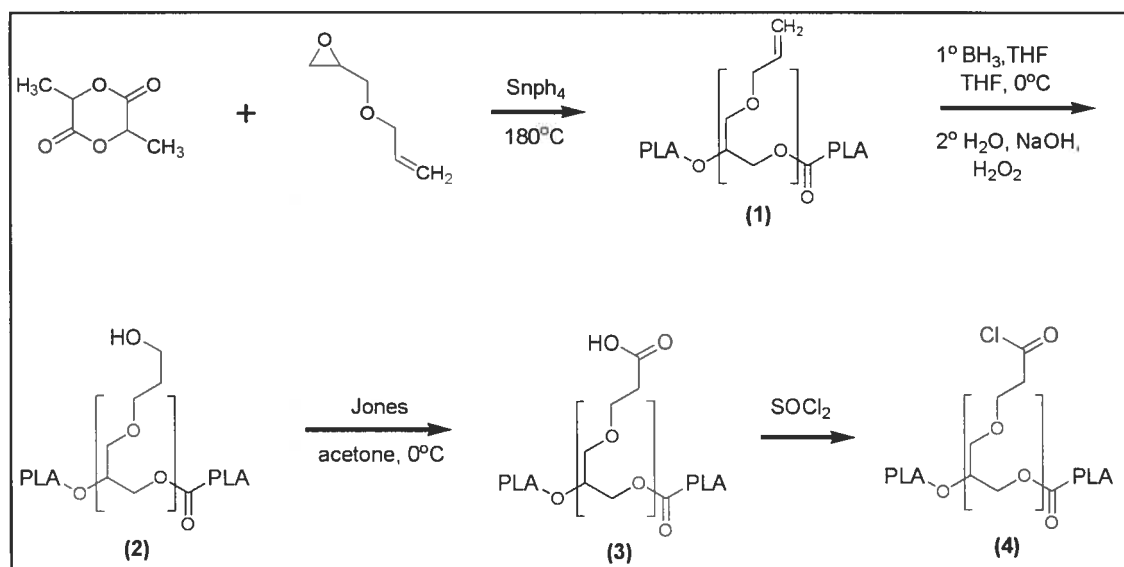
mmol) was added and stirred at 180 °C under an inert atmosphere (argon) for 6 h. The mixture was cooled to ambient temperature. The crude reaction product was dissolved in 50 ml of ethyl acetate and then 100 ml of water was added. The organic solvent was removed by rotary evaporation, which resulted in precipitation of the polymer in water. The water was discarded to obtain the polymer. The mixture was washed three times and dried under vacuum to yield 20.8 g (95%) of white polymer (Scheme 1); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2996, 2945, 1753, 1599, 1454, 1383, 1303, 1181, 1129, 1084, 1043, 694 and 569;  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.5 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ) and 5.2 (m, 1H, CH);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 16 ( $\text{CH}_3$ ), 69 (CH), 169 ( $\text{C}=\text{O}$ ); Elemental analysis calculated: C, 50.2%; H, 5.6%, found: C, 49.7%; H, 6.0%;  $M_n$  19,700 g/mol;  $M_w$  35,000 g/mol.

**4. Synthesis of PLA with 1% hydroxyl pendant group (2).** PLA with allyl pendant group (19.9 g, 2.7 mmol) was dissolved in 300 mL of THF at 0 °C, to which  $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$  [1 M] (3 mL, 3 mmol) was added. The reaction was carried out for 2 h at 0 °C. To this reaction mixture, 25 ml of water, 25 ml of NaOH [3 N] and 25 ml of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%) were added. After 1 h, 300 ml of water was added. The solvent was removed by rotary evaporation. Then, the precipitated polymer (2) was purified with the same method used for compound (1). The polymer was dried under vacuum to give 14.9 g (75%) of white polymer (Scheme 1); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2997, 1756, 1455, 1383, 1182, 1131, 1087, 1044, 871, 755, 689 and 569;  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.5 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ) and 5.2 (m, 1H, CH);  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 16 ( $\text{CH}_3$ ), 69 (CH), 169 ( $\text{C}=\text{O}$ ); elemental analysis calculated: C, 50.0%; H, 5.6%, found: C, 49.4%; H, 5.8%;  $M_n$  22,000 g/mol,  $M_w$  36,400 g/mol.

**5. Synthesis of PLA with 1% carboxylic pendant group (3).** PLA with hydroxyl pendant group (8.4 g, 1.15 mmol) was dissolved with 500 mL of acetone at 0 °C. Then Jones reagent was prepared;  $\text{CrO}_3$  (0.23 g, 2.30 mmol),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.23 mL) and water (0.70 mL) in this order and added to polymer solution. The mixture was stirred for 3 h at 0 °C and the reaction was stopped by addition of 30 mL of isopropanol. To this reaction mixture, 500 mL of HCl (1 N) was added. The solvent was removed by rotary evaporation. The

precipitate was washed using the same method as for compound (1). The polymer was dried under vacuum to yield 7.8 g (93%) of white polymer (Scheme 1); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2997, 1750, 1455, 1362, 1182, 1130, 1085, 1044, 754, 755, 688 and 570;  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.5 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ) and 5.2 (m, 1H, CH);  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 16 ( $\text{CH}_3$ ), 69 (CH), 169 ( $\text{C}=\text{O}$ ); elemental analysis calculated: C, 50%; H, 5.6%, found: C, 49.5%; H, 6.0%;  $M_n$  14,000 g/mol;  $M_w$  31,200 g/mol.

**6. Synthesis of PLA with 1% chloro alkoyl pendant group (4).** A reaction flask containing PLA with carboxylic pendant group (2 g, 0.27 mmol) in  $\text{SOCl}_2$  (25mL) was stirred at ambient temperature for 2h. After this time, thionyl chloride was removed by rotary evaporation. The precipitate was collected to give 1.23 g (61%) of white polymer (Scheme 1); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3050, 1750, 1454, 1363, 1350, 1225, 1100 and 867;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.5 (m, 3 H,  $\text{CH}_3$ ) and 5.2 (m, 1 H, CH);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 16 ( $\text{CH}_3$ ), 69 (CH), 169 ( $\text{C}=\text{O}$ ); Elemental analysis calculated: C, 49.8%; H, 5.6%, Found: C, 51.1%; H, 5.9%.



**Scheme 1. Synthesis of grafted PLA**

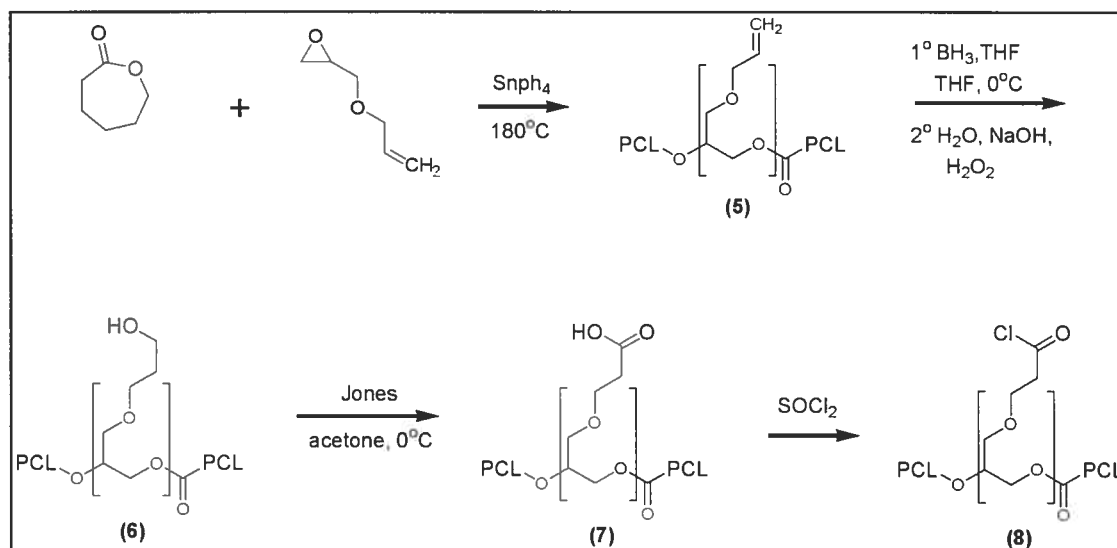
**7. Synthesis of PCL with 20% allyl pendant group (5).** The polymer (5) was prepared similarly to (1) but caprolactone was used rather than dilactide. It is noteworthy that one mole of caprolactone gives one mole of caproic acid although one mole of dilactide gives two moles of lactic acid. The modified PCL was synthesized with 20% of grafting sites and yielded 85 % of a polymer with waxy appearance (Scheme 2);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.31-1.46 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 1.57-1.72 (m, 4 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.26-2.40 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 4.01-4.11 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{O}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 24.56 ( $\text{CH}_2$ ), 25.51 ( $\text{CH}_2$ ), 28.32 ( $\text{CH}_2$ ), 34.10 ( $\text{CH}_2$ ), 64.15 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 173.58 (CO);  $M_n$  5,200 g/mol;  $M_w$  12,100 g/mol.

**8. Synthesis of PCL with hydroxyl pendant group 20% (6).** The polymer (6) was synthesized like (2) except using polymer (5) rather than (1) to yield 66% of polymer (Scheme 2);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.31-1.46 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 1.57-1.72 (m, 4 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.26-2.40 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 4.01-4.11 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{O}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 24.56 ( $\text{CH}_2$ ), 25.51 ( $\text{CH}_2$ ), 28.32 ( $\text{CH}_2$ ), 34.10 ( $\text{CH}_2$ ), 64.15 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 173.58 (CO);  $M_n$  4,100 g/mol;  $M_w$  8,500 g/mol.

**9. Synthesis of PCL with 20% carboxylic pendant group (7).** The polymer (7) was synthesized like (3) except using polymer (6) rather than (2) to yield 87% of polymer (Scheme 2);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.31-1.46 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 1.57-1.72 (m, 4 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.26-2.40 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 4.01-4.11 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{O}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 24.56 ( $\text{CH}_2$ ), 25.51 ( $\text{CH}_2$ ), 28.32 ( $\text{CH}_2$ ), 34.10 ( $\text{CH}_2$ ), 64.15 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 173.58 (CO);  $M_n$  2,500 g/mol;  $M_w$  4,000 g/mol.

**10. Synthesis of PCL with 20% chloro alkoyl pendant group (8).** The polymer (8) was synthesized like (4) except using polymer (7) rather than (3) to yield 60% of polymer (Scheme 2);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.31-1.46 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 1.57-1.72 (m, 4 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.26-2.40 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 4.01-4.11 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{O}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR

(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 24.56 ( $\text{CH}_2$ ), 25.51 ( $\text{CH}_2$ ), 28.32 ( $\text{CH}_2$ ), 34.10 ( $\text{CH}_2$ ), 64.15 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 173.58 (CO).



**Scheme 2. Synthesis of grafted PCL**

**11. Synthesis of PGLY with 2% allyl pendant group (9).** The polymer (9) was synthesized by mixing glycidine and allyl glycidyl ether in toluene. The reaction mixture was refluxed for 16 h. To wash the obtained gum, the mixture was dissolved in 50 mL of ethyl acetate and then 100 mL of water was added. The organic solvent was removed by extraction while the polymer was retrieved in the aqueous phase. The polymer mixture was washed three times and dried under vacuum. One mole of glycidine gave two moles of glycine as one mole of dilactide gave two moles of lactic acid. The modified glycine polymer with 2% substitution of pendant group was synthesized to obtain 50% yield of white polymer (Scheme 3); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2987, 2876, 1749, 1682, 1507, 1469, 1436, 1338, 1250, 1215, 1074, 912, 829, 805, 669, 519 and 508;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.8 (s, 2 H,  $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 42 ( $\text{CH}_2$ ), 165 ( $\text{C}=\text{O}$ ); Elemental analysis calculated: C, 42.9 %; H, 5.4 %; N, 23.6 %, Found: C, 42.3 %; H, 5.3%; N, 24.3 %.

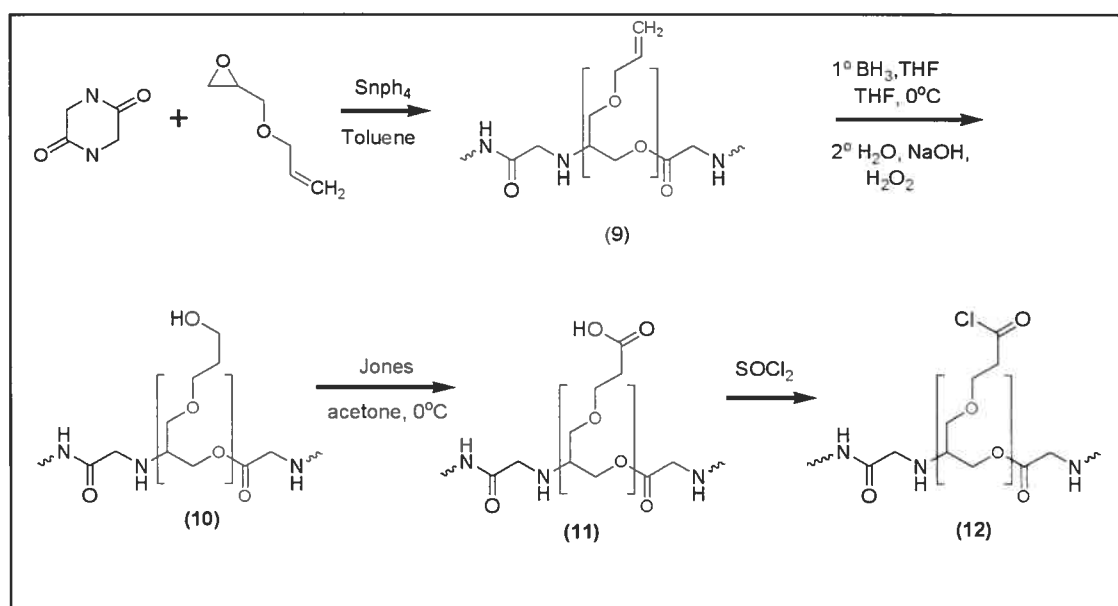
**12. Synthesis of PGLY with 2% hydroxyl pendant group (10).** The polymer (10) was synthesized as described for (2) except using polymer (10) rather than (1) to yield 69% of white polymer (Scheme 3); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3672, 3035, 2984, 2871, 2830, 1680, 1540, 1516, 1466, 1436, 1335, 1071, 910, 830, 803, 687 and 520;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 2.0 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ )  $\delta$  (ppm) 42 ( $\text{CH}_2$ ), 165 ( $\text{C=O}$ ); Elemental analysis calculated: C, 42.8 %; H, 5.4 %; N, 23.5 %, Found: C, 42.3 %; H, 5.4%; N, 24.5 %.

**13. Synthesis of PGLY with 2% carboxylic pendant group (11).** The polymer (11) was synthesized as described for (3) except using polymer (10) rather than (2) to yield 46% of white polymer (Scheme 3); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3672, 3648, 2987, 2868, 2780, 1749, 1699, 1539, 1513, 1470, 1435, 1366, 1337, 1219, 1073, 912, 838, 805, 687 and 520;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 2.0 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 42 ( $\text{CH}_2$ ), 165 ( $\text{C=O}$ ).

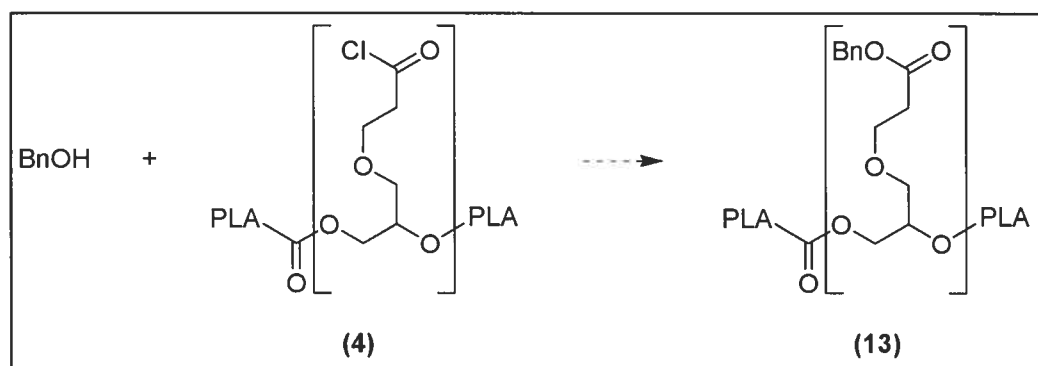
**14. Synthesis of PGLY with chloro alkoyl pendant group 2% (12).** The polymer (12) was synthesized similar to (4) except using polymer (11) rather than (3) to yield 98% of white polymer (Scheme 3). This compound was used directly for benzylation; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2994, 2870, 1752, 1510, 1452, 1361, 1269, 1186, 1128, 1098, 1046, 913, 867, 736 and 700;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 2.0 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 42 ( $\text{CH}_2$ ), 165 ( $\text{C=O}$ );  $M_n$  4,900 g/mol;  $M_w$  6,700 g/mol.

**15. Benzylation (13).** To 95 mg (0.01 mmol) of polymer (4) in a chloroform solution, 100 mL of benzylic alcohol, 100 mL of pyridine and 10 mg (0.08 mmol) of DMAP were added. The solution was stirred for 3 h and then neutralized by 1 N HCl. The organic layer was collected and evaporated successively to obtain 100 mg of (13). The same protocol was used for benzylation of polyglycine-co-ether (12) with a difference in the purification procedure. We dialysed the mixture solution, firstly with a solution of isopropanol 70% and secondly with water to remove benzylic alcohol. The solution was

then freeze-dried (Scheme 4); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2994, 2870, 1752, 1510, 1452, 1361, 1269, 1186, 1128, 1088, 1046, 913, 867, 736 and 700;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.8 (m, 127H,  $\text{CH}_2$ ), 7.4 (m, 5H, 5(CH benzylic));  $M_n$  6,000 g/mol;  $M_w$  9,200 g/mol.



**Scheme 3. Synthesis of grafted glycine polymers**

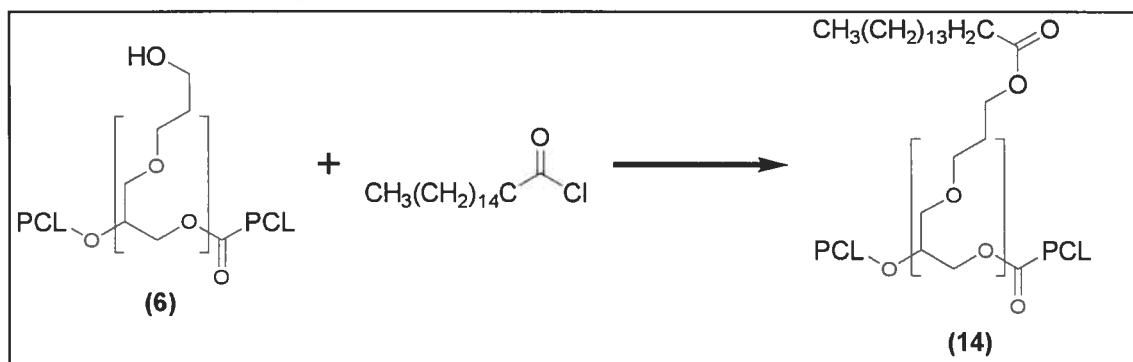


**Scheme 4. Benzylation of polymer (4)**

**16. Palmitoylation (14).** To a solution of 5 g (0.4 mmol) of polymer (6) in 50 mL pyridine, 4.67 g (0.017 mol) of palmitoyl chloride was added. The solution was stirred for 3h and then, 10 mL of water was added. The solvent was evaporated and the product was



crystallized in ether to obtain 3.2 g (64% yield) of (14) (Scheme 5);  $M_n$  8,800 g/mol;  $M_w$  13,500 g/mol.



Scheme 5. Palmitoylation of polymer (6)

### 3.1.4 Results and Discussion

#### 3.1.4.1 General synthesis approach of grafted polylactide

The approach was to synthesize polyesters having reactive groups on branched structures. The dilactide is well described and industrially used.<sup>10</sup> Allyl glycidyl ether (AGE) was added to obtain a PLA backbone with pendant allyl functions (1). This molecule, with epoxy function, gets attached to the polymer backbone after ring opening polymerization. The allyl function does not react if the reaction is carried without an inert atmosphere. The presence of oxygen can lead to radical polymerization of allyl function. On the other side, the polymerization of PLA cannot be conducted in presence of air without significant degradation.

The polymer (1) is an intermediate to obtain various chemical functions because the allyl function can be easily modified. For example, by hydroboration, we have obtained a primary alcohol (2) and by oxidation of alcohol with Jones mixture, we have obtained the corresponding acid (3).

The synthesis was carried out to obtain PLA grafted with allyl, hydroxyl and carboxyl functions at 1, 5, 20 and 30% (moles/moles of respective monomers). At 30% grafting density, the obtained polymer was very viscous. The hydrophilic character of the polymer makes the purification difficult. For this reason, it was not possible to carry out the oxidation of the corresponding alcohol to carboxylic acid.

**Thermal studies of grafted PLA.** The glass transition temperature ( $T_g$ ) of different polymers is shown in Table 1.  $T_g$  is accompanied by long-range molecular motion, greater rotational freedom and consequently more segmental motion of the chains. The increased motion increases the space between the atoms which itself, increases the specific volume.<sup>11</sup>  $T_g$  is influenced by different factors such as the functional groups present, polarity and molecular weight of the polymer. Adding olefin to polymer (1) decreased  $T_g$  because it minimizes the interaction between the chains of the polymers. Increasing grafting density of alcohol function also decreased  $T_g$  because of increased hydrophilic character of these polymers. On the other hand, the conversion of olefin to alcohol (2) increased  $T_g$ . This increase is probably due to the increased polarity of OH bond as compared to that of the allyl group. The more polar group led to higher  $T_g$  because of increased van der Waals interactions and hydrogen bonding.<sup>12</sup> The  $T_g$  increased again when the alcohol is converted into carboxylic acid (3) probably for the same reason. Finally, the  $T_g$  depends on the polymer molecular weight and as the molecular weight increased,  $T_g$  increased.<sup>13</sup>

**Table 1. Tg of grafted PLA**

PLA grafted (%)	Allyl (°C)	Alcohol (°C)	Acid (°C)
1	27	28	31
5	20	26	34
20	13	16	24
30	18	17	N/A

**SEC analysis of grafted PLA.** The SEC analysis results of branched polymers measured against polystyrene standard are shown in Table 2. We observed a general trend for a decrease of molecular weight in number ( $M_n$ ) and in weight ( $M_w$ ) during the synthesis. The increase of allyl glycidyl ether content decreased the molecular weight. Likewise,  $M_n$  and  $M_w$  decreased upon oxidation of the allylic group. This could be explained by the hard conditions in oxidation step that could lead to hydrolysis of ester links.

**Table 2. Molecular weight of PLA grafted by SEC with standard condition**

PLA grafted (%)	Allyl			Alcohol			Acid		
	$M_n^*$	$M_w^*$	$M_w/M_n$	$M_n^*$	$M_w^*$	$M_w/M_n$	$M_n^*$	$M_w^*$	$M_w/M_n$
1	19,700	35,000	1.8	22,000	36,400	1.7	14,000	31,200	2.2
5	7,200	14,900	2.1	3,300	4,300	1.3	5,200	9,200	1.7
20	5,300	11,400	2.1	2,800	4,400	1.6	2,900	4,700	1.6
30	3,300	5,300	1.6	2,200	3,200	1.5	N/A		

\* (g/mol)

The residual moisture present and temperature fluctuation during the polymerization and excessive amounts of NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> used during oxidation step might have decreased the molecular weight. These factors were optimized to increase the molecular weight of the polymers. Indeed, we could minimize the decrease in the molecular weight in the subsequent step of hydroboration/oxidation by decreasing the amount of NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The new optimized conditions were 1.5 equivalent of NaOH (3 N) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). With constant temperature throughout the polymerization, adequate drying of the starting materials and polymers at each step and milder acidic and basic oxidation conditions, we could obtain grafted PLA with  $M_w$  of 60,000 g/mol (Table 3) with no change in the

polydispersity. The effect of the catalyst concentration and time of polymerization on  $M_w$  of polyesters have been investigated by different research groups.<sup>14</sup> It has also been shown in our laboratory that the temperature of reaction (step 1) and the time of polymerization were the most critical factors affecting the molecular weight of the polymers as compared to the other factors changing the catalyst and its concentration (data not shown).

Transesterification and hydrolysis can contribute to the  $M_w$  decrease shown in table 2. Using milder acidic and basic oxidation conditions, we could minimize the effect of hydrolysis on  $M_w$ . Table 3 shows relatively constant  $M_w$  when reaction was carried out in optimized conditions. Probably, the rate of transesterification was also minimized under these conditions.

**Table 3. Molecular weight of PLA grafted by SEC with optimized conditions**

PLA grafted	Allyl			Alcohol			Acid		
	$M_n^*$	$M_w^*$	$M_w/M_n$	$M_n^*$	$M_w^*$	$M_w/M_n$	$M_n^*$	$M_w^*$	$M_w/M_n$
1%	35,800	59,800	1.7	32,600	55,700	1.7	35,400	59,900	1.7

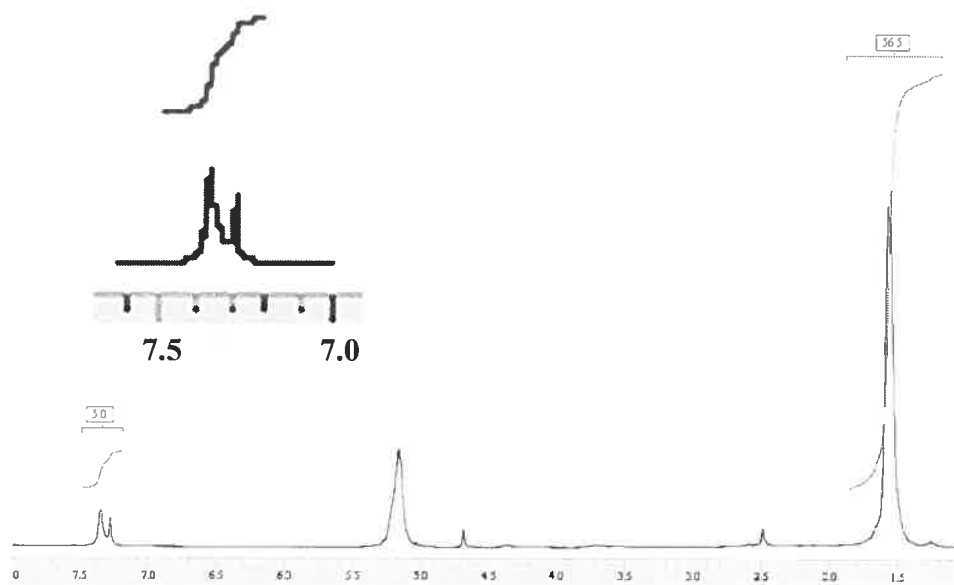
\* (g/mol)

**Structural analysis by NMR of PLA grafted.** The allyl glycidyl ether has one chiral carbon, which made NMR analysis difficult because each proton is diastereotopic. The signals for these protons are numerous and with a relatively low intensity compared to protons located on the PLA chain. Even when there is 20% substitution, it was not possible to distinguish correctly these protons. In  $^{13}\text{C}$  NMR also, no signals were observed. However, the signals of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  were clear for the lactide part of the polymer.

An experiment was conducted to confirm the possibility to graft other molecules by ester bond on this polymer backbone. The benzyl alcohol was selected to be grafted on the polymer (4). Benzyl alcohol gives characteristic signals in NMR for the aromatic protons

that are not present in the spectrum of polymeric backbone (3). Other advantage of benzyl alcohol is that the excess can be easily washed out because it is miscible with water. The scheme 4 shows the benzylation and the figure 1 shows the NMR of PLA grafted with 5% benzyl group.

The benzylation of the grafted domain confirms the percentage of pendant groups on the polymer. This study also proved that the reactivity of dilactide was as good as that of the epoxy. The branched parts are not only present at the end but all along the polymer backbone. This also means, a versatile branched polymers based on PLA could be successfully synthesized.



**Figure 1. <sup>1</sup>H NMR spectra of the polymer (13). The signal at 7.4 ppm represents the five aromatic protons of the benzyl function. The signal at 1.5 ppm represents the methyl protons of lactic acid. The ratio of the integration show 5.0 % of benzyl grafted.**

### 3.1.4.2 General synthetic approach of grafted polycaprolactone.

The previous synthesis with dilactide could be repeated with other starting monomer to obtain copolymers of pharmaceutical interest. In order to synthesize grafted PCL, we used caprolactone in place of dilactide. The same synthetic procedure was used. The synthesis of grafted PCL was done with 20% substitution.

**Molecular weight of PCL.** The molecular weights of polymer (5), (6) and (7) substituted with 20% pendant groups as determined by SEC are shown in Table 4. As in case of grafted PLA, we observed that the molecular weight of grafted PCL also decreased at each step of the synthesis. Polydispersity showed the same trend. As explained earlier, it may be due to the harsh conditions of oxidation. Hydrolysis could be minimized by changing conditions.

**Table 4. Molecular weight by SEC of grafted PCL**

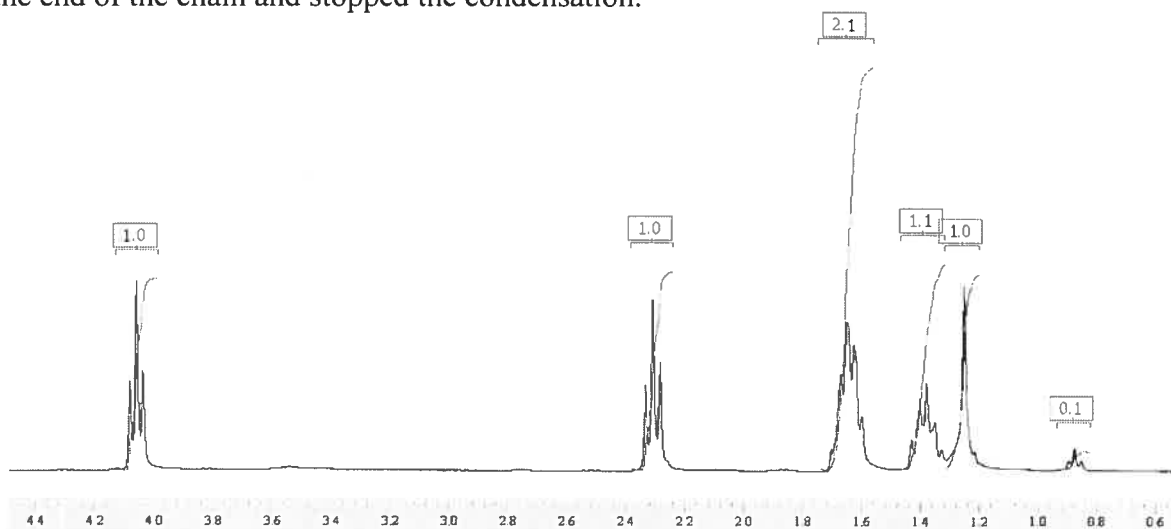
PCL grafted	Allyl			Alcohol			Acid		
	$M_n^*$	$M_w^*$	$M_w/M_n$	$M_n^*$	$M_w^*$	$M_w/M_n$	$M_n^*$	$M_w^*$	$M_w/M_n$
1%	5,200	12,100	2.3	4,100	8,500	2.0	2,500	3,900	1.6

\* (g/mol)

**Structural analysis of grafted PCL by NMR.** Similar to PLA with pendant carboxylic function (3), a coupling experiment was performed on (6). Palmitoyl chloride was grafted on PCL having pendant alcoholic function (6) (Scheme 5). The polymer obtained (14) was insoluble in ether but the palmitic acid is soluble, therefore, the excess of reagent could be removed.

The interpretation of NMR spectrum (Figure 2) of polymer (14) is less straight forward than for the polymer (13) because, with grafted benzyl group, the aromatic signal is

strong. For polymer (14), the signal observed at 1.2–1.3 ppm corresponds to the twelve hydrogens of the palmitate  $\text{CH}_2$ . The signal at 0.8–0.9 ppm is due to the palmitate  $\text{CH}_3$ . The palmitate  $\text{CH}_2\text{COO}$  protons signal is mixed with that from  $\text{CH}_2\text{COO}$  protons in PCL. As there is peaks overlapping between 1.2 and 1.4 ppm, integration of the signal is not possible. It is however possible to evaluate a ratio of 1 part of palmitate for twelve part of caproic, for a substitution of 8%. This value is less than the expected 20%. Two reasons can explain this difference: either the esterification reaction was not complete or the incorporation of AGE was not quantitative. The palmitoyl chloride was added in excess. This suggests that the AGE was not regularly inserted in the polymeric backbone due to the high reactivity of the ring with seven atoms of caprolactone. Opening of the cyclic ring of caprolactone needs less energy ( $\Delta_f H_{\text{ion}} = 629 \text{ kJ/mol}$ ) than the ring opening of AGE ( $\Delta_f H_{\text{ion}} = 966 \text{ kJ/mol}$ ).<sup>15</sup> Less reactive AGE has to compete with caprolactone for polymerization. Therefore, AGE has been inserted in the chain but with low efficacy or it has been inserted at the end of the chain and stopped the condensation.



**Figure 2.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of the polymer (14). The characteristic signal of PCL can be observed with the characteristic signal of palmitate. The signal at 1.2–1.3 ppm represents the twelve  $\text{CH}_2$  of palmitate and the signal at 0.8–0.9 ppm is due to the  $\text{CH}_3$  of palmitate.

### 3.1.4.3 General synthesis approach for grafted PGLY

Polyglycine-co-ether was synthesized as described in Section 2 above. As the decomposition of glycidine occurred before its fusion over 300 °C, it was not possible to proceed with the polymerization by fusion as for PLA and PCL. Therefore, the polymerization was carried out in toluene solution. This is the only difference between synthesis of grafted PLA, PCL and PGLY. PGLY was grafted with 2% pendant groups.

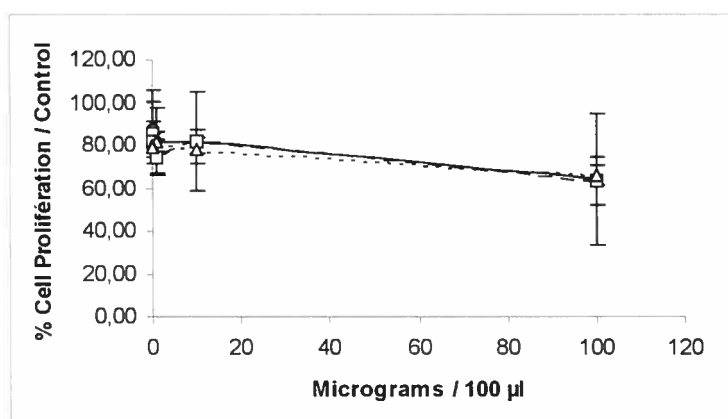
**Molecular weight of PGLY.** Due to the poor solubility of polyglycine in chloroform and in most solvents, the measurement of molecular weight by SEC could be done only on PGLY (12) and PGLY-grafted with benzyl group.  $M_n$  and  $M_w$  of 4,900 g/mol and 6,800 g/mol, respectively were observed for PGLY (12). The benzyl grafted PGLY showed  $M_n$  and  $M_w$  of 6,100 g/mol and 9,200 g/mol respectively.

**Structural analysis of grafted PGLY by NMR.** In the same way as benzyl grafted on PLA, the calculated percentage of grafted blocks was found to be 1.6 % (for an expected 2% grafting density). The NMR spectra confirmed the proposed structure. The benzylation of grafted domain showed that the reactivity of glycidine is as good as the reactivity of epoxy of allyl glycidyle ether.

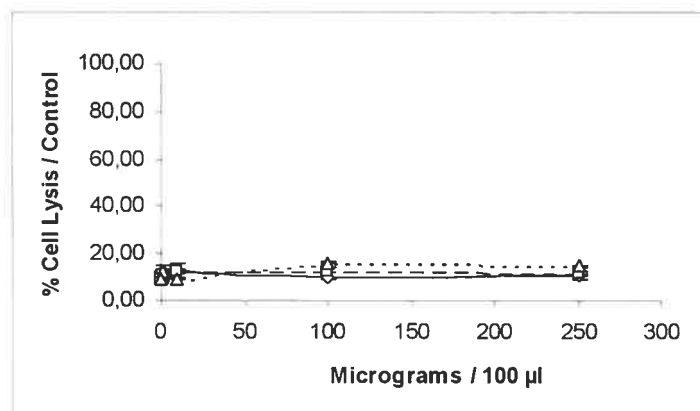
**Cytocompatibility.** Cytocompatibility of polymers (1), (2) and (3) was determined as described in the experimental section. MTT colorimetric assay was used for the assessment of cell proliferation since it measures tetrazolium ring cleavage by active mitochondria of the living cells<sup>9</sup>, whereas, level of lactate dehydrogenase (LDH) in cell supernatant indicates level of cells lysis. The MTT assay showed no effect on cell proliferation for all the polymers at concentration lower than 1 mg/mL (Figure 3 and 4). The presence of the pendant groups with allyl, alcohol or carboxylic functions did not affect the compatibility of PLA as seen for PLA with 1 % pendant groups (Figure 3). Moreover, the LDH assay showed no significant cell death in the complete range of the



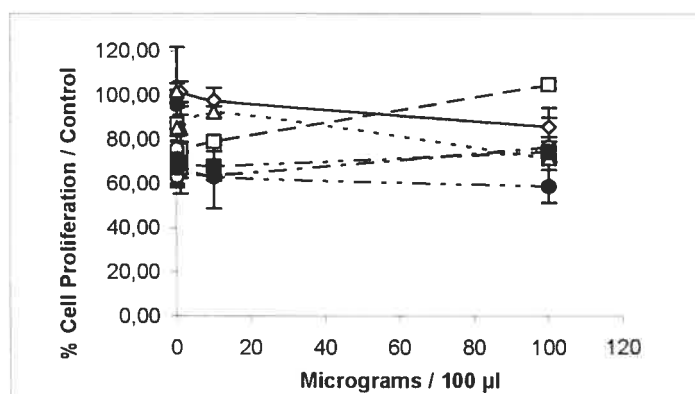
concentrations studied for PLA with 1% pendant group (Figure 4). Similar results for MTT and LDH assays were obtained with 5, 10 and 20% PLA pendant groups (data not shown). Figure 5 shows the results of cell proliferation for different polymers (PLA, PCL and PGLY) with carboxylic pendant group at various grafting densities. The results showed the constant proliferation for all the polymers tested. The slight increase at the highest polymer concentration may be due to polymer absorbance. These *in vitro* results are preliminary but are encouraging for further toxicology studies.



**Figure 3. MTT cell proliferation assay. PLA with 1 % allyl pendant group (◇), PLA with 1 % hydroxyl pendant group (□) and PLA with 1 % carboxylic pendant group (Δ).**



**Figure 4. LDH cell lysis assay. PLA with 1 % allyl pendant group (◇), PLA with 1 % hydroxyl pendant group (□) and PLA with 1 % carboxylic pendant group (Δ).**



**Figure 5. Cytocompatibility of carboxyl PLA, PCL and PGLY as measured with MTT cell proliferation assay. PLA with 1% carboxy pendant group (◇), PLA with 5 % carboxyl pendant group (□) and PLA with 10 % carboxylic pendant group (Δ). PLA with 20 % carboxyl pendant groups (○); PCL with 20 % carboxyl group (■); PGLY with 2 % carboxyl pendant group (●)**

### 3.1.5 Conclusion

A large variety of new biopolymers having pendant groups were synthesized by a versatile method. Moreover, the ester linkage of the pendant group is degradable by hydrolysis. The PLA has been chosen as starting polymeric backbone; however, it was possible to use other polymeric backbones as proved successfully by use of PCL and PGLY. The use of allyl glycidyl ether for grafting part allows easy modifications. The inert character of alkene group under the polymerization conditions is the principal advantage. So, the ring opening polymerization of lactide, caprolactone or glycidine and epoxy using tin as a catalyst provided a family of new polymers which could be grafted with various bioactive ligands through an ester link and could be used for drug targeting. We recently showed that DNA can form complexes with PLA with grafted salen groups.<sup>7</sup> Methoxy-PEG grafted on PLA has been already used successfully in our laboratory to prepare stealth nanoparticles.<sup>8</sup> Similarly, bioadhesive polymer grafted with a ligand specific to E-selectin has been synthesized in the same manner and its application will be discussed in an upcoming paper.

### 3.1.6 Acknowledgment

The authors wish to thank NSERC for the financial support.

### 3.1.7 References

- (1) Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E. *J. Controlled Release* **2001**, *70*, 1–20.
- (2) Yoo, H. S.; Park, T. G. *J. Controlled Release* **2004**, *96*, 273–283.
- (3) Bizzarri, R.; Chiellini, F.; Solaro, R. *Macromolecules* **2002**, *35*, 1215–1223.
- (4) Tian, D.; Dubios, P.; Grandfils, C.; Jerome, R. *Macromolecules* **1997**, *30*, 406–409.
- (5) Ouchi, T.; Ohya, Y. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2004**, *42*, 453–462.

- (6) Finne, A.; Albertsson, A. C. *J. Polym. Sci, Part A: Polym. Chem.* **2004**, *42*, 444–452.
- (7) Nadeau, V.; Hildgen P. *Molecules* **2005**, *10*, 105–113.
- (8) Sant, S.; Nadeau, V.; Hildgen, P. *J. Controlled Release* **2005**, *107*, 203–214.
- (9) Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- (10) Langer, R. *Chem. Eng. Commun* **1980**, *6*, 1–48.
- (11) Stevens, M. P. *Polymer chemistry an introduction*. New York: Oxford University Press; **1999**.
- (12) Bovey, F. A.; Kwei, T. K. *Macromolecules; an introduction to polymer science*. New York: Academic Press; **1979**.
- (13) Dalnoki-Veress, E.; Forrest, J. A.; Murray C.; Gigault C.; Dutcher J. R. *Phys. Rev. E* **2001**, *6303*, 1801-1833.
- (14) Hyon, S. H.; Jamshidi, K.; Ikada, Y. *Biomaterials* **1997**, *18*, 1503–1508.
- (15) Lide, D. R. *CRC handbook of chemistry and physics*. Boca Raton: CRC Press; **1998**.

## 3.2 But

La recherche de polymères biodégradables et biorésorbables suscite l'attention grâce à leurs nombreuses applications médicales. Les polymères principalement développés sont les polyesters aliphatiques tels que les PLA, les PCL et les PGLY. Leur biodégradation en métabolites non-toxiques, leur aptitude à former des fibres et des films, leur porosité ainsi que leurs propriétés à favoriser la prolifération cellulaire au contact de leur surface font de ces polymères des biomatériaux versatiles.<sup>170</sup>

La présente section a pour but de développer une nouvelle famille de polymères branchés et biodégradables qui serviront de véhicule de transport nanoparticulaire de drogue ou de vecteur non-viral dans le traitement du cancer. La synthèse de copolymère formé à partir du 1,2-époxy-3-allyloxypropane et de lactide, de caprolactone ou de glycine se doit d'être simple et rapide. Des preuves structurales doivent être apportées afin de confirmer l'obtention des macromolécules voulues.

## 3.3 Résultats obtenus et complément d'information

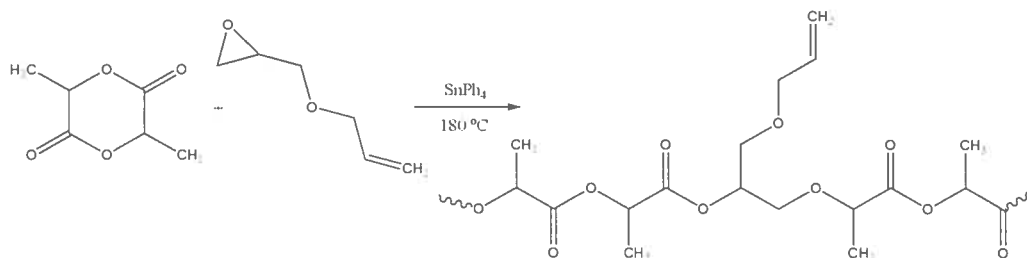
Les résultats obtenus ont été publiés en 2005 dans la revue «Polymer», volume 46, page 11263 à 11272 sous le titre : Synthesis of new versatile functionalised polyesters for biomedical applications. Les auteurs sont : Véronique Nadeau, Grégoire Leclair, Shilpa Sant, Jean-Michel Rabanel, Richard Quesnel et Patrice Hildgen. Tous les auteurs précédents ont contribué par leurs idées au développement de ces polymères greffés. La section qui suit est un résumé de cet article.

### 3.3.1 La synthèse

Les synthèses du PLA, de la PCL ainsi que de la PGLY greffée ont été effectuées à l'aide de 1,2-époxy-3-allyloxypropane (**Figure 46, Page 136**). Par la suite, les fonctions

alyles des embranchements créés par l'époxyde ont été transformées en alcool (**Figure 47, Page 137**), en acide (**Figure 48, Page 138**), puis en chlorure d'acide (**Figure 49, Page 139**) afin de permettre l'addition de différentes molécules dont l'alcool benzylique susceptible d'aider la caractérisation structurale. Les polymères ainsi obtenus ont été caractérisés par IR, RMN- $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , analyse élémentaire, GPC et le DSC. Les spectres RMN confirment la formation de polymères greffés.

Réaction:



Mécanisme :

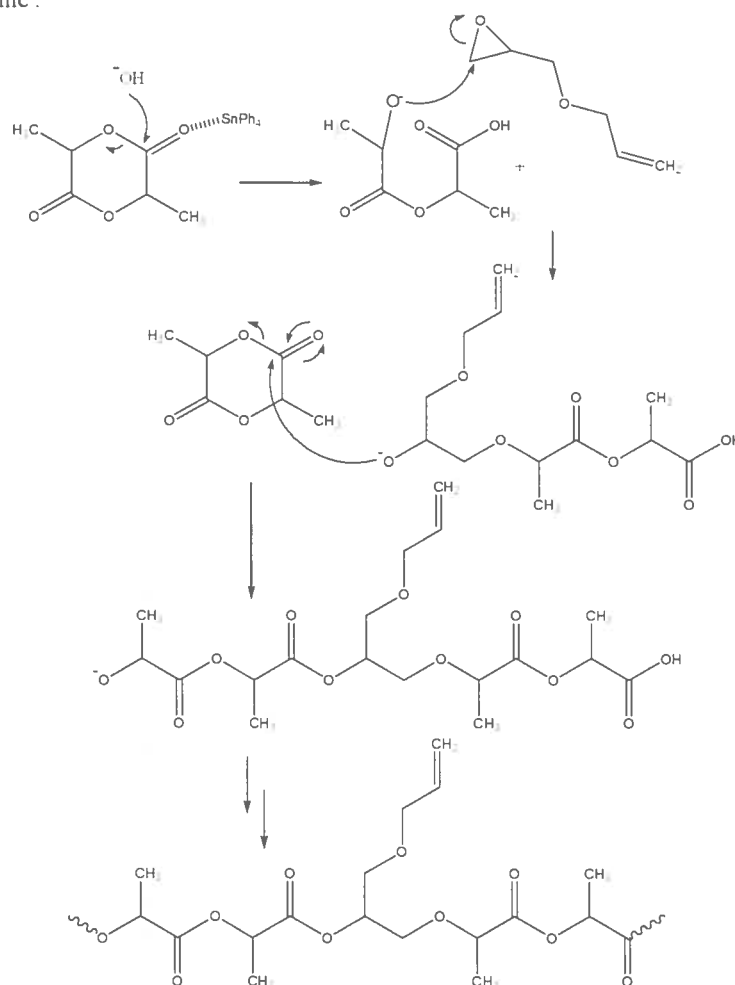


Figure 46. Synthèse par ouverture de cycle du PLA greffé.

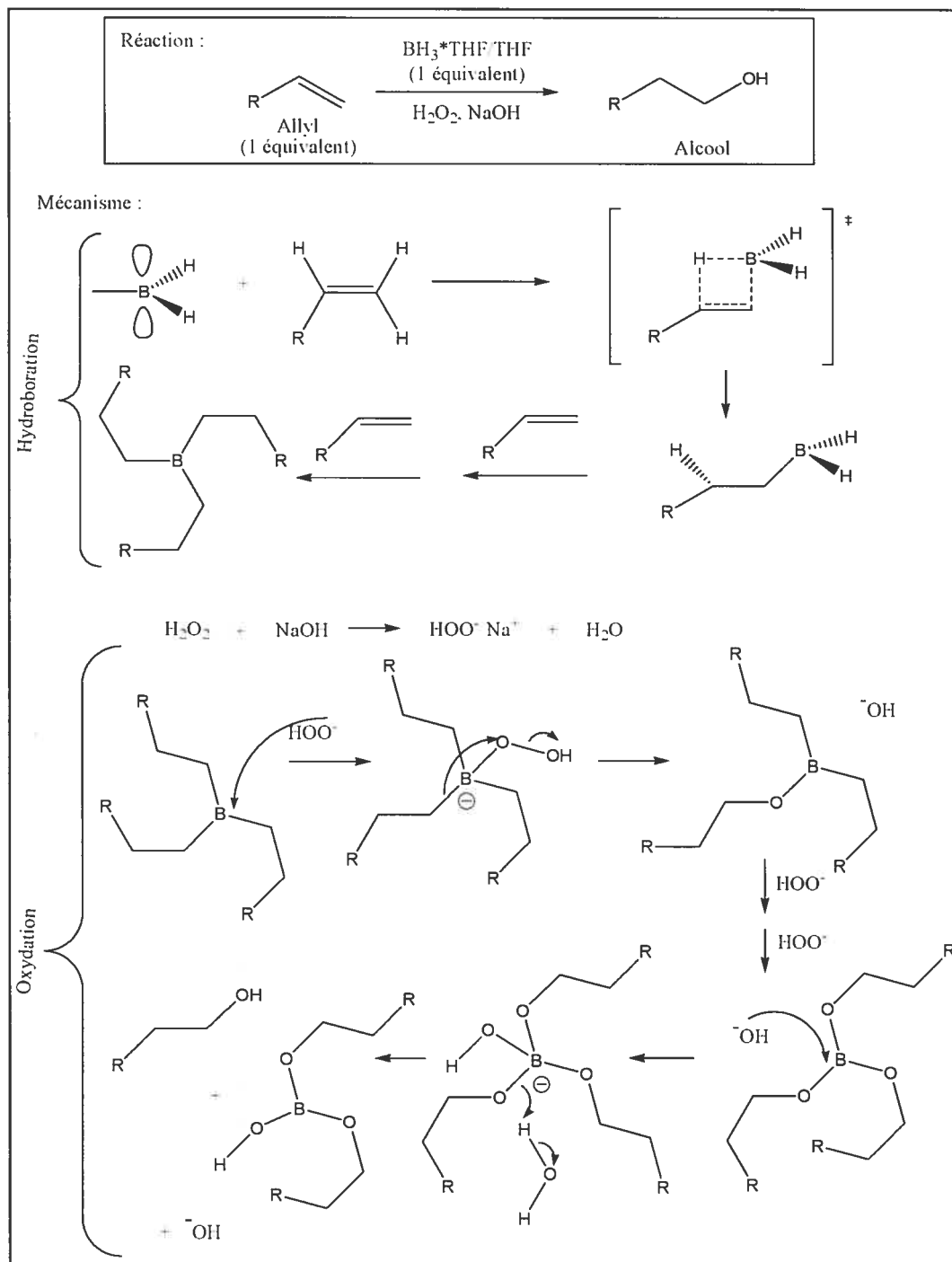


Figure 47. Mécanisme de l'hydroboration-oxydation



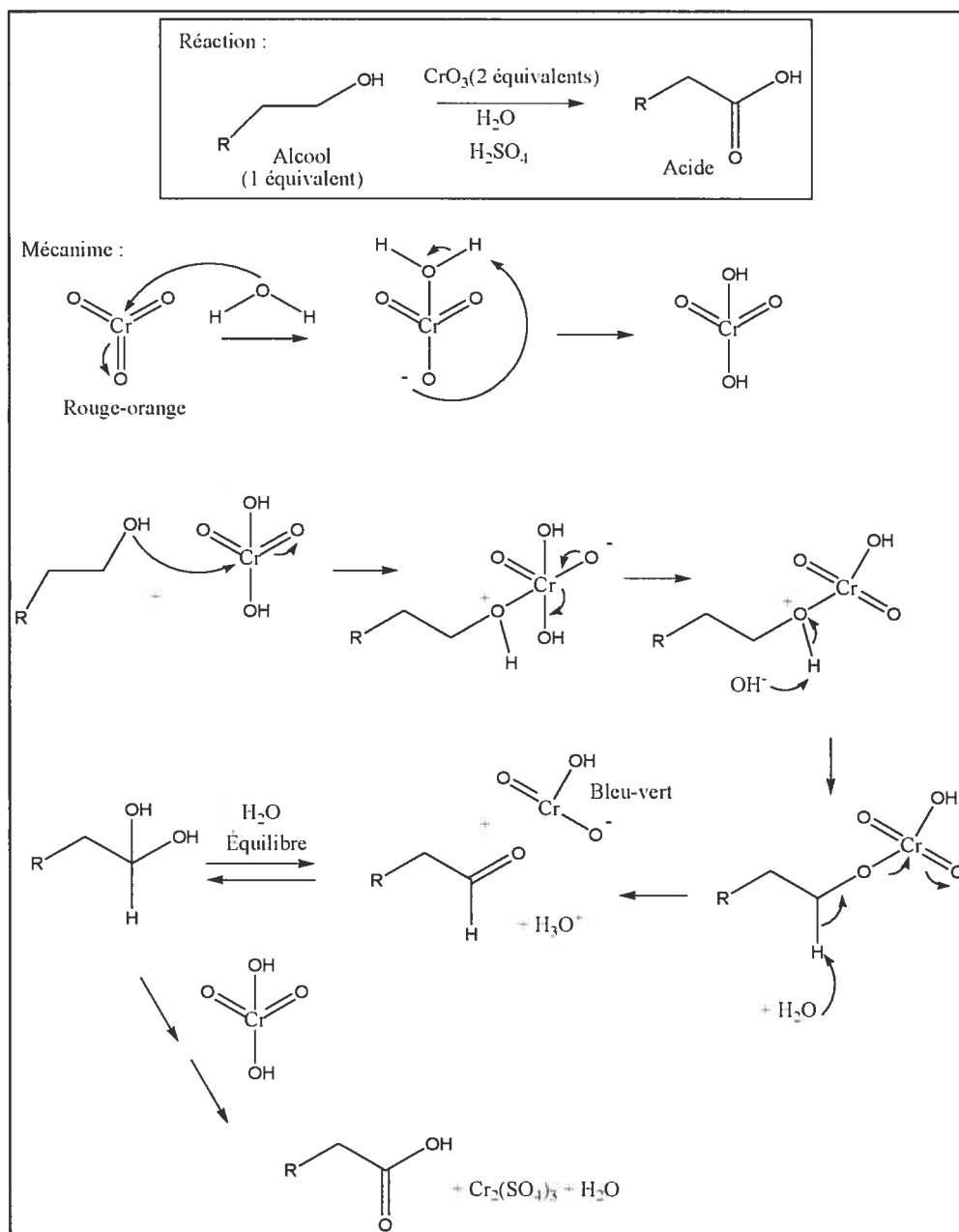


Figure 48. Mécanisme de la réaction de Jones

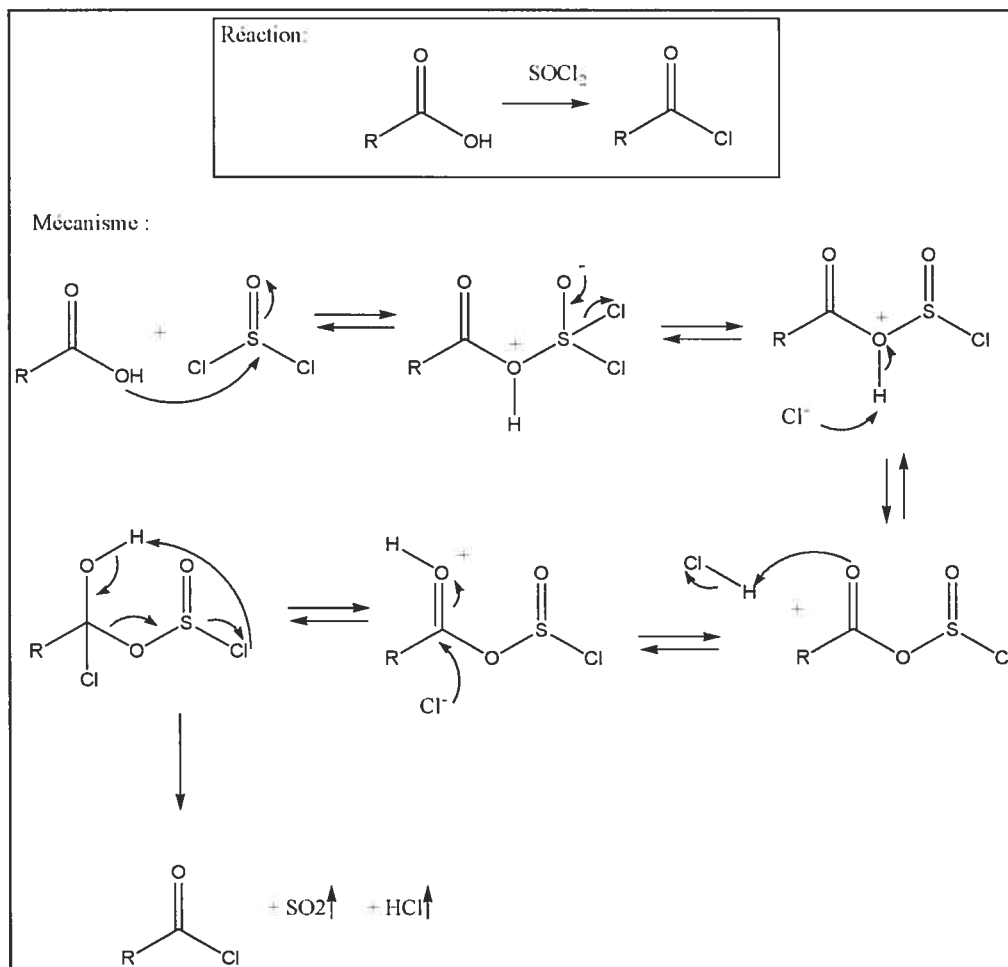


Figure 49. Mécanisme d'action du chlorure de thionyle

### 3.3.2 L'analyse thermique

L'étude thermique sur les PLA greffés indique que la température de transition vitreuse ( $T_g$ ) diminue avec l'augmentation du nombre de 1,2-époxy-3-allyloxypropane présent sur la chaîne polymérique. Ce même comportement est observé lorsque les fonctions terminales des groupements latéraux sont des allyl, des alcools ou des acides. Il en résulte que, plus on augmente la quantité d'oléfine dans le polymère, moins il y a d'interactions entre les chaînes polymériques car, plus le nombre de groupements latéraux

présents sur la chaîne de PLA augmente, plus le domaine où il y a interactions intermoléculaires est restreint. Les groupements latéraux ne favorisent pas le recouvrement sur une grande surface de plusieurs molécules. De plus, la rigidité de la structure polymérique diminue avec l'ajout de groupements latéraux entraînant une diminution de la Tg (PLA Tg = 57 °C, PLA-allyl<sub>10%</sub> = 27 °C, PLA-allyl<sub>5%</sub> = 20 °C, PLA-allyl<sub>20%</sub> = 13 °C).<sup>171</sup> Par ailleurs, on remarque que la transformation des oléfines en alcool, puis en acide augmente la valeur de Tg. Le caractère polaire des liaisons alcools et acides comparativement aux groupements alcènes est responsable de l'augmentation de la Tg. Les groupements alcools et acides peuvent établir des liaisons hydrogène et de van der Waals augmentant, ainsi, le nombre d'interactions entre les molécules. Finalement, l'augmentation de la masse molaire augmente la valeur de Tg.<sup>171</sup> Plus les chaînes sont longues, plus il y a des interactions interchaînes et, donc, plus il faut fournir de l'énergie afin que les chaînes soient libres de mouvement (état caoutchouteux).

### 3.3.3 L'analyse de la masse molaire

L'analyse de la masse molaire des PLA et des PCL greffés démontre que celle-ci diminue à chaque étape de synthèse (passage de l'alcène à l'alcool et à l'acide). Nous en avons conclu que les conditions d'oxydation sont responsables de cette diminution de la masse molaire. De plus, l'ajout de 1,2-époxy-3-allyloxypropane semble diminuer la masse molaire totale. En adoucissant les conditions d'oxydation, on maintient des masses molaires constantes indépendamment des étapes de synthèse. De cette façon, on minimise l'hydrolyse chimique des liens esters causés par un milieu réactionnel trop acide ou trop basique et ainsi, la chute prématurée de la masse molaire est évitée.

L'analyse de la masse molaire des PGLY greffées indique qu'ils ont entre 5 000 et 8 000 g/mol. Par contre, étant donné que la solubilité des PGLY greffés est très faible dans tous les solvants organiques, l'analyse par chromatographie à perméation de gel de certains

PGLY greffés s'est avérée impossible. Par conséquent, aucune information supplémentaire reliant la structure de PGLY et la masse molaire n'a pu être extrapolée.

### 3.3.4 Cytotoxicité

Les analyses MTT et LDH des PLA, PCL et PGLY greffés confirment leur non-toxicité sur un domaine de concentration s'étalant de 0 à 1 mg/mL et indiquent que ni la transformation des branches du PLA, ni la quantité d'embranchement n'affectent la toxicité du produit.

## 3.4 Résultats supplémentaires

### 3.4.1 Synthèse du PLA-PGLY greffé

De la même façon, différents polymères constitués d'un mélange de PLA et de PGLY ont aussi été développés. La polymérisation de la glycine ne peut être effectuée par fusion, contrairement au PLA et au PCL, puisque celui-ci semble brûler vers 300°C. L'étape de polymérisation du PGLY survient plutôt en milieu organique (toluène). Par contre, lors de la synthèse du PLA-PGLY, la présence de PLA permet d'effectuer la réaction de polymérisation par fusion à 180°C entre l'acide lactique, la glycine et l'époxyde.

Dans un premier temps, 0.01 mol de glycine anhydre et de dilactide sont mis en présence de 0.004 mol de 1,2-époxy-3-allyloxypropane afin de concevoir un polymère de type PLA<sub>49%</sub>-PGLY<sub>49%</sub>-allyl<sub>2%</sub>. La réaction se produit avec les mêmes conditions de synthèse et d'isolation que pour le PLA-allyl<sub>1%</sub> (**Article 2, Page 112**). On obtient ainsi un polymère de couleur beige. IR (cm<sup>-1</sup>) 3672, 3613, 2996, 2866, 2777, 1752, 1650, 1512, 1452, 1362, 1185, 1130, 1090, 1045, 870, 756, 689 et 520; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.5 (m, 4.9H, CH<sub>3</sub>), 2.1 (m, 0.08, CH<sub>2</sub>) et 5.2 (m, 1H, CH); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) 19 (PLA-CH<sub>3</sub>), 27 (PGLY-CH<sub>2</sub>), 69 (PLA-CH), 155 (PGLY-C=O) et 169 (PLA-C=O) (**Figure**

50, Page 142); Analyse élémentaire calculée C, 47.1%; H, 5.5%; N, 10.5% Trouvée: C, 50.1%; H, 5.7%; N, 0.9%.

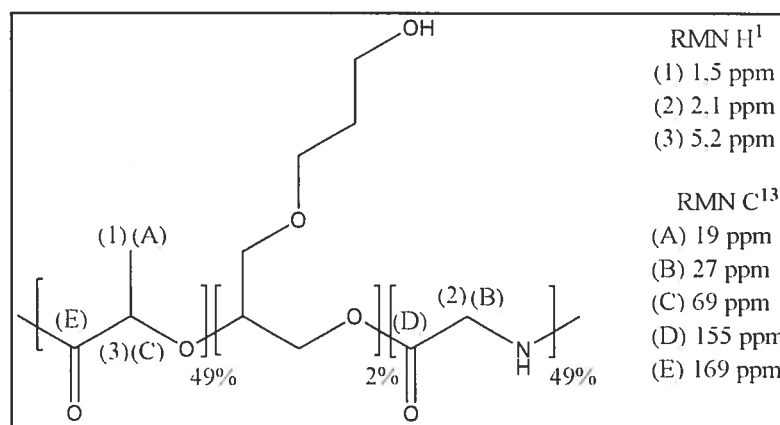


Figure 50. Identification RMN

Dans un deuxième temps, 0.01 mol de glycine anhydre et de dilactide sont mis en présence de 0.002 mol d'allyl glycidyl éther afin de concevoir un polymère de type  $\text{PLA}_{46\%}\text{-PGLY}_{46\%}\text{-allyl}_{8\%}$ . La réaction se produit en utilisant les mêmes conditions de synthèse et d'isolation que pour le  $\text{PLA-allyl}_{1\%}$  (Article 2, Page 112). On obtient ainsi un polymère de couleur beige. IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3672, 3665, 2993, 2866, 2774, 1746, 1650, 1512, 1452, 1362, 1267, 1186, 1128, 1047, 865, 751, 688 et 520;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.5 (m, 3.2H,  $\text{CH}_3$ ), 1.7 (m, 0.19H,  $\text{CH}_2$ ) and 5.2 (m, 1H, CH);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO-D}_6$ )  $\delta$  (ppm) 20 ( $\text{PLA-CH}_3$ ), 28 ( $\text{PGLY-CH}_2$ ), 69 ( $\text{PLA-CH}$ ), 155 ( $\text{PGLY-C=O}$ ) et 169 ( $\text{PLA-C=O}$ ); Analyse élémentaire calculée C, 48.7%; H, 5.9%; N, 9.4% Trouvée: C, 50.1%; H, 6.1%; N, 0.8%.

La synthèse du  $\text{PLA}_{49\%}\text{-PGLY}_{49\%}\text{-alcool}_{2\%}$  se produit sous les mêmes conditions que pour le  $\text{PLA-alcool}_{1\%}$  (Article 2, Page 112). IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3672, 3613, 2994, 2866, 2781, 1754, 1512, 1452, 1362, 1188, 1132, 1092, 1045, 755, 688 et 520;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.5 (m, 3.1H,  $\text{CH}_3$ ), 2.1 (m, 0.7H,  $\text{CH}_2$ ) et 5.2 (m, 1H, CH);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO-D}_6$ )  $\delta$  (ppm) 18 ( $\text{PLA-CH}_3$ ), 32 ( $\text{PGLY-CH}_2$ ), 69 ( $\text{PLA-CH}$ ), 155 ( $\text{PGLY-C=O}$ ) et 169 ( $\text{PLA-}$

C=O); Analyse élémentaire calculée C, 46.8%; H, 5.6%; N, 10.4% Trouvée: C, 50.1%; H, 5.9 %; N, 0.8%.

La synthèse du PLA<sub>46%</sub>-PGLY<sub>46%</sub>-alcool<sub>8%</sub> se produit sous les mêmes conditions que pour le PLA-alcool<sub>1%</sub> (**Article 2, Page 112**). IR (cm<sup>-1</sup>) 2993, 2871, 2783, 1746, 1512, 1451, 1364, 1266, 1187, 1127, 1087, 1047, 866, 750 et 687; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.5 (m, 3.1H, CH<sub>3</sub>), 2.1 (s, 0.18H, CH<sub>2</sub>) et 5.2 (m, 1H, CH); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) 20 (PLA-CH<sub>3</sub>), 32 (PGLY-CH<sub>2</sub>), 65 (PGLY-CH<sub>2</sub>), 69 (PLA-CH), 155 (PGLY-C=O) et 169 (PLA-C=O); Analyse élémentaire calculée C, 47.7%; H, 6.0%; N, 9.2% Trouvée: C, 50.0%; H, 6.3%; N, 0.6%.

La synthèse du PLA<sub>49%</sub>-PGLY<sub>49%</sub>-acide<sub>2%</sub> se produit sous les mêmes conditions que pour le PLA-acide<sub>1%</sub> (**Article 2, Page 112**). IR (cm<sup>-1</sup>) 3672, 3648, 2996, 2866, 2777, 1753, 1512, 1451, 1362, 1186, 1131, 1091, 1045, 870, 755, 688 et 520; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.5 (m, 3.3H, CH<sub>3</sub>), 2.1 (s, 0.07H, CH<sub>2</sub>) et 5.2 (m, 1 H, CH); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) 20 (PLA-CH<sub>3</sub>), 32 (PGLY-CH<sub>2</sub>), 69 (PLA-CH), 155 (PGLY-C=O) et 169 (PLA-C=O); Analyse élémentaire calculée C, 46.6%; H, 5.5%; N, 10.4% Trouvée: C, 50.2%; H, 5.5%; N, 0.8%.

La synthèse du PLA<sub>46%</sub>-PGLY<sub>46%</sub>-acide<sub>8%</sub> se produit sous les mêmes conditions que pour le PLA-acide<sub>1%</sub> (**Article 2, Page 112**). IR (cm<sup>-1</sup>) 3672, 3665, 2993, 2866, 2774, 1746, 1512, 1452, 1366, 1257, 1196, 1138, 1049, 863, 751, 678 et 520; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.5 (m, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.1 (m, 0.17H, CH<sub>2</sub>) et 5.2 (m, 1H, CH); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) 20 (PLA-CH<sub>3</sub>), 32 (PGLY-CH<sub>2</sub>), 69 (PLA-CH), 155 (PGLY-C=O) et 169 (PLA-C=O).

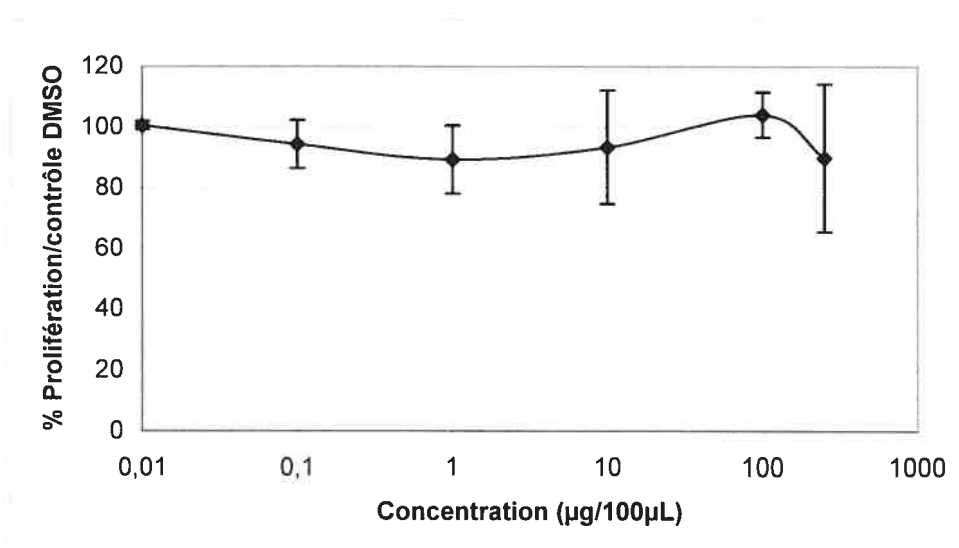
La synthèse du PLA<sub>49%</sub>-PGLY<sub>49%</sub>-chlorure d'acide<sub>2%</sub> et du PLA<sub>46%</sub>-PGLY<sub>46%</sub>-chlorure d'acide<sub>8%</sub> se produit sous les mêmes conditions que pour le PLA-chlorure d'acide<sub>1%</sub> (**Article 2, Page 112**). Les produits polymériques ainsi obtenus n'ont pas été caractérisés et ont servi directement à la benzylation.

La benzoylation du PLA<sub>49%</sub>-PGLY<sub>49%</sub>-chlorure d'acide<sub>2%</sub> et du PLA<sub>46%</sub>-PGLY<sub>46%</sub>-alcool<sub>8%</sub> s'effectue avec le même protocole que pour le PGLY-co ether. PLA<sub>49%</sub>-PGLY<sub>49%</sub>-benzylé<sub>2%</sub>; IR (cm<sup>-1</sup>) 2995, 2868, 1755, 1186, 1091, 907, 727 et 649; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.5 (m, 27.8H, CH<sub>3</sub>), 2.1 (m, 2.6H, CH<sub>2</sub>), 5.2 (m, 9.3H, CH) et 7.4 (m, 1H, CH); Mn 4836 g/mol; Mp 3856 g/mol. PLA<sub>46%</sub>-PGLY<sub>46%</sub>-benzylé<sub>8%</sub>; IR (cm<sup>-1</sup>) 2994, 2871, 2816, 1754, 1496, 1360, 1269, 1185, 1090, 1043, 912, 740 et 699; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.5 (m, 2.1H, CH<sub>3</sub>), 2.1 (m, 0.5H, CH<sub>2</sub>), 5.2 (m, 0.7H, CH) et 7.4 (m, 1H, CH).

Le dosage par RMN des polymères benzylés nous permet de mesurer la quantité de chaque constituant. C'est donc en comparant l'intégration des pics représentant la glycine, le lactide ainsi que le benzyle que nous pouvons en déduire les structures suivantes : pour le PLA<sub>49%</sub>-PGLY<sub>49%</sub>-benzylé<sub>2%</sub> on obtient plutôt PLA<sub>86%</sub>-PGLY<sub>12%</sub>-benzylé<sub>2%</sub> et pour le PLA<sub>46%</sub>-PGLY<sub>46%</sub>-benzylé<sub>8%</sub> on obtient PLA<sub>60%</sub>-PGLY<sub>23%</sub>-benzylé<sub>17%</sub>. La RMN mais aussi l'analyse élémentaire montrent une quantité d'azote, provenant de la glycine, entre 6 et 9 fois plus petite que celle attendue. Il en résulte donc que la synthèse par fusion de la glycine est difficile à produire même avec la présence de dilactide. Le point de fusion élevé de la glycine anhydre (>300°C) explique le faible taux de glycine obtenue lors de la polymérisation. De plus, sachant que la polymérisation survient par l'ouverture des cycles, il est aussi probable que celle-ci survient plus rapidement pour l'époxyde et l'acide lactique que pour la glycine. Dans ce cas, une réaction dans un solvant comme le toluène aurait été plus appropriée.

### 3.4.2 Cytotoxicité

L'analyse MTT *in vitro* (Figure 51, Page 145) du PLA<sub>86%</sub>-PGLY<sub>12%</sub>-acide<sub>2%</sub> confirme la biocompatibilité de ce polymère.



**Figure 51. Analyse MTT *in vitro* du PLA<sub>86%</sub>-PGLY<sub>12%</sub>-acide<sub>2%</sub>**

### 3.5 Conclusion

Le développement et la caractérisation d'une structure polymérique capable de recevoir facilement des molécules variées ont été réalisés. Le PLA, le PCL ainsi que le PGLY ont été choisis pour leur caractère biodégradable et biocompatible. De plus, ceux-ci sont approuvés par la FDA. Toutes les étapes de synthèse sont reproductibles comme le montre la variété de structures obtenues. Plusieurs preuves de synthèse ont été obtenues à l'aide de l'IR, de la RMN et de l'analyse élémentaire. Les différentes structures de PLA, de PCL, de PGLY et de PLA-PGLY greffées peuvent maintenant être considérées sous différentes formes comme biomatériaux pour des applications médicales.



## **Chapitre 4. Utilisation des polymétallosalens greffés en thérapie génique**

*«Nous menons notre vie quotidienne sans presque rien comprendre au monde qui est le nôtre. Nous accordons peu de pensées à la machinerie qui engendre la lumière du soleil, rendant ainsi la vie possible, à la gravité qui nous colle à une terre qui, autrement, nous enverrait tournoyer dans l'espace, ou aux atomes dont nous sommes faits et dont la stabilité assure notre existence. À l'exception des enfants (...), peu d'entre nous passent beaucoup de temps à se demander pourquoi la nature est telle qu'elle est; d'où vient le cosmos ou s'il a toujours été là (...).»*

**Carl Sagan**

## **4.1 Article 3: AFM study of a New Carrier Based on PLA and Salen Copolymers for Gene Therapy.**

Véronique Nadeau and Patrice Hildgen\*

Laboratoire de Nanotechnologie Pharmaceutique, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, CP 6128, succursale Centre Ville, Montreal, (Québec) H3C 3J7 Canada. Tel.: +1 (514)-6343-6448, Fax: +1 (514) 343-2102.

\* Author to whom correspondence should be addressed;

e-mail: [REDACTED]

Received: 18 May 2004 / Accepted: 4 July 2004 / Published: 31 January 2005

### **4.1.1 Abstract**

The aim of this study was to synthesize novel biodegradable charged polymers to be used in DNA complexation for genetic delivery in different diseases. A new copolymer of PLA and complexed Schiff bases was synthesized in several steps. This copolymer will be used as a nanocarrier. Also, AFM comparative studies in tapping mode were performed on a cationic copolymer, on a PLA-Schiff base copolymer, on an oriented and oriented film, and on the DNA-cationic complex. The results indicated a difference in the topology and on phase picture of AFM film with or without cationic charge.

**Keywords:** AFM, PLA, Genetic Therapy, Vector, Salen, Schiff base.

### **4.1.2 Introduction**

In genetic disorders, the attempt to replace the faulty or absent gene is known as gene therapy. If successful, this leads to normal working of the cell. Gene therapy is

frequently studied in immunotherapy<sup>1</sup>, for viral infections<sup>2</sup> and for tissue regeneration<sup>3</sup>. Unfortunately, the unprotected DNA is quickly degraded by the nucleases present in plasma. A lot of obstacles have to be overcome to transport a gene because the targets are inside precise cells. It must be able to pass through the cell membrane, survive intracellular endosomal degradation and finally reach the nucleus of the cell. So, the ideal tool to transport and protect DNA is a non-viral carrier called a polyplex. For example, the strength of the binding between plasmids and polymers yields a collapsed complex that protects nucleic acid against degradation during intracellular transport.<sup>4</sup> Controlling the erosion rate of the polymers allows the controlled release of the gene from the carrier. Moreover, polymers present the possibilities to modify the surface of the carrier and to target selective cells.<sup>5</sup> In the present study, we have synthesized new grafted co-polymers based on a polylactide backbone (PLA) to complex DNA. Since atomic force microscopy (AFM), is a powerful tool for semi-quantitative and qualitative measurements on molecular shape and distribution<sup>6</sup>, we have performed AFM comparative studies on cationic salen grafted PLA (CS-PLA) and on Schiff's base grafted PLA (SBPLA), on non-oriented or oriented polymer films. Then we used the same method to study the complex of DNA with CS-PLA.

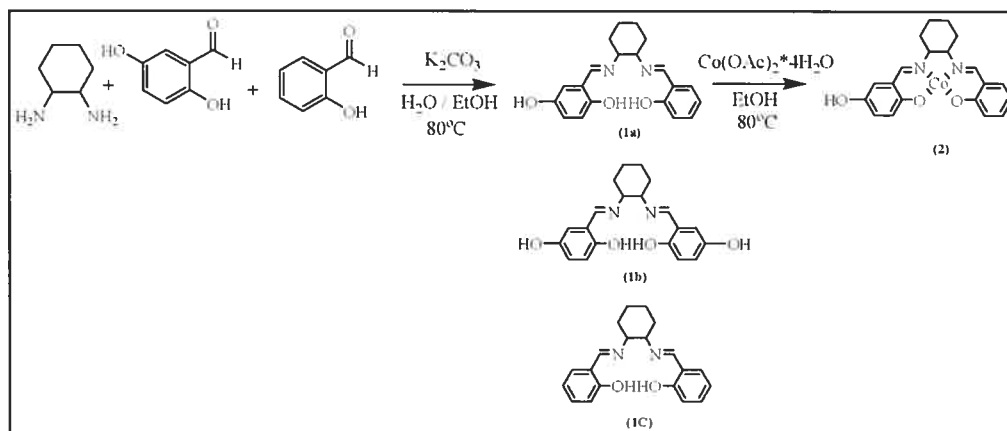
### **4.1.3 Results and Discussion**

#### **4.1.3.1 General description**

Because the proposed carriers are made of (cis)-PLA (99%), they have a potential to mimic the helical structure of DNA and at the same time to ensure the degradation ability of polymer. The remaining 1% of polymer is allyl glycidyl ether which give pendant arms along the helical PLA. Then, we grafted a Schiff's base complexed to a metal (i.e. cobalt) on the PLA chain to obtain a pendant positive charge. The final macromolecule allows complexation of DNA.

#### 4.1.3.2 Schiff bases and complex synthesis.

Schiff's bases were synthesized based on the salicylidene tetradentate ligand derived from 2,5-dihydroxybenzaldehyde, salicylaldehyde and diamines. Schiff's base can be readily synthesized based on the method of Larrow and Jacobsen<sup>7</sup> with some modifications to the isolation process. The Schiff base was then complexed with cobalt (Scheme 1). Structures of Salen and complexes were confirmed by <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, IR and elemental analysis.

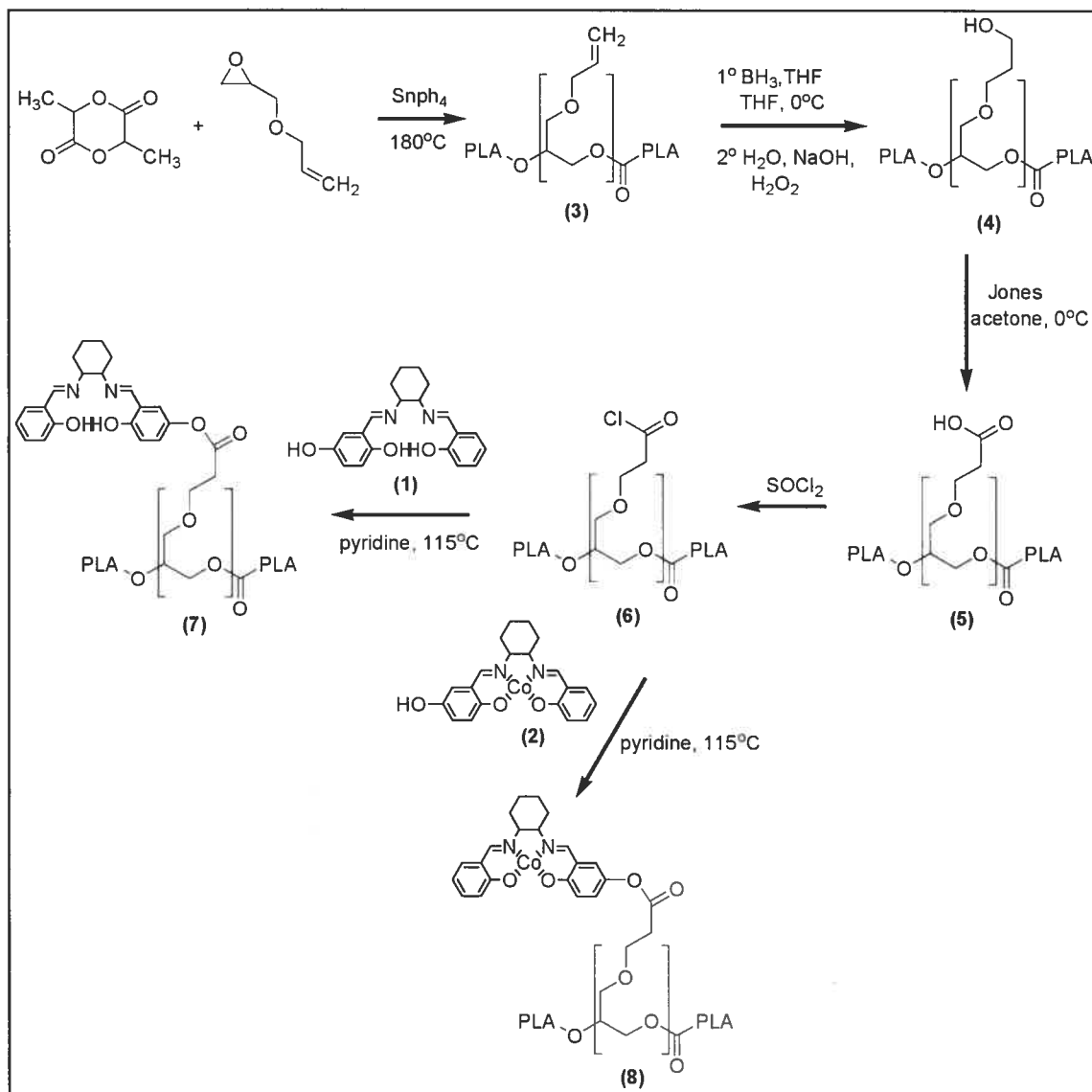


Scheme 1. Synthesis of the Schiff base and the complex.

#### 4.1.3.3 Carrier synthesis based on PLA and salen.

Allyl glycidyl ether was added to the dilactide, obtain PLA with an allyl function, **3**. This epoxide function gets inserted into the polymer during the ring opening polycondensation (Scheme 2). To prevent reaction of the allyl function the polycondensation was done under inert atmosphere (Ar), as the presence of oxygen could initiate a radical polymerization of the allyl function. Moreover, the polycondensation of PLA cannot occur in presence of oxygen or moisture. The polymer **3** is an intermediate to have various chemical functions because the allyl function can be easily modified. By hydroboration, a primary alcohol **4** was obtained. By oxidation of alcohol using Jones

mixture, the corresponding carboxylic acid **5** was obtained. The latter was converted to the acyl chloride **6**. Finally the SB-PLA (**7**) and the CS-PLA (**8**) were obtained by esterification.



**Scheme 2. Synthesis of the PLA and salen copolymer**

#### **4.1.3.4 AFM study on SB-PLA and CS-PLA non-oriented film.**

As shown in Figures 1a and 1c, the topological surface structures respectively of SB-PLA and CSPLA of non-oriented films are different. The organization of SB-PLA looks like spherulitic structures as shown in Figure 1a. Whereas, CS-PLA non-oriented film (Figure 1c) shows a less organized structure than SB-PLA. The presence of cationic metal ions changes the surface organization of polymers.

#### **4.1.3.5 AFM study CS-PLA non-oriented versus oriented film.**

Comparing AFM results for non-oriented CS-PLA films (Figures 1c and 1d) to oriented film (1e and 1f), in topographic mode Figures 1c and 1e present white toroidal zones on both pictures. In phase mode, the polymer in Figure 1d seems homogeneous, whereas Figure 1f shows an increase of white parts corresponding to a different chemical structure of the heightened part. It is clear that the process drives toroidal shapes at the interface. This phenomenon is not observed in Figure 1d. As in the oriented film, the arm from allyl glycidyl part was exposed at the surface, the pale zone in Figure 1f probably represents the arm and complex section with cobalt atom.

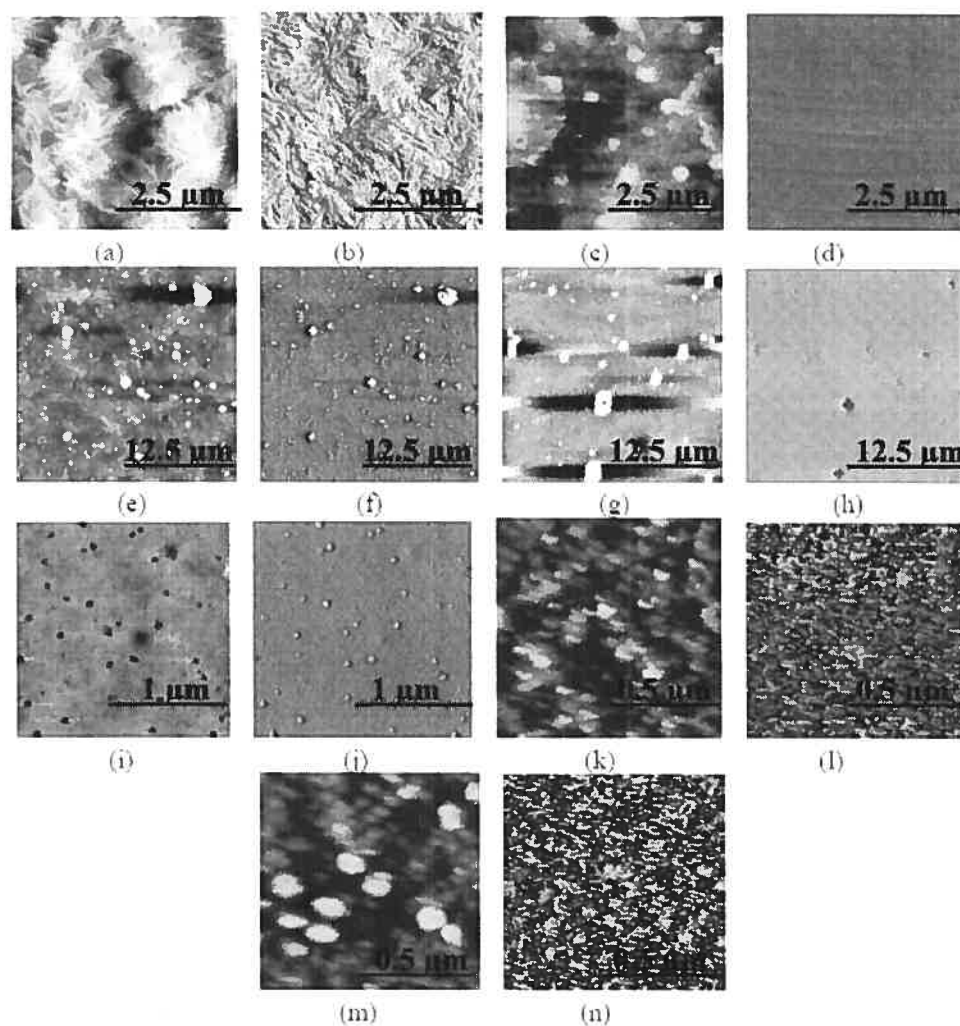
#### **4.1.3.6 AFM study on CS-PLA and SB-PLA oriented film.**

Topographic images of CS-PLA and SB-PLA (Figures 1e and 1g) in oriented films show some pale heightened regions. The same structures can be seen in Figures 1f and 1h, which show a difference in chemical structure of the surface representing the arm of polymer. Picture 1f shows some torus with a white center whereas Picture 1h, in contrast to 1f, shows a black center. This probably can be explained considering that the complexation gives a more rigid structure than a non-complexed Schiff's base. Rigid structure pushes back the AFM probe and appears pale on 1f. Assuming that the arm groups are oriented on top of the surface as represented by the pale zone on figure 1j, we can calculate how many arms are on oriented CS-PLA. The quantitative analysis gives 1.7% of pale zone on the

total area of the picture. The grafted PLA has 1% (molar ratio) of arms by synthesis and the volume's ratio is approximately close. The process of orienting the film optimizes the number of arm groups at the surface and tends to increase this percentage. But 1.7% confirmed that pale zones are the arm on PLA structure.

#### **4.1.3.7 AFM study on complexed DNA-CS-PLA.**

The topography seen in Figures 1k and 1m looks the same except for the size of DNA strands. Topographic shapes seen in Figure 1m are bigger (100-300 nm) than in Figure 1k (50-100 nm). The complexing action of CS-PLA on DNA can explain this observation. Using phase mode, we observed that all fragments of DNA strand in Figure 1k are represented by heightened pale zone in Figure 1l. The DNA-CS-PLA in phase mode (Figure 1n) does not show the same behavior. Each molecular fragment appeared homogeneous in topographic mode (Figure 1m) however in phase mode (Figure 1n) it appeared more heterogeneous, with a mix of dark regions (CS-PLA) and pale regions (DNA). We believe that these represents the different chemical structures. This confirms that complexation between DNA and CS-PLA occurred. Moreover an electrophoretic study of the DNA-CS-PLA compare to bulk DNA and polymer demonstrates the complexation of DNA.



**Figure 1.** AFM study on SB-PLA non-oriented film (a in topology and b in phase mode), CS-PLA non-oriented film (c in topology and d in phase mode), CS-PLA oriented film (e in topology and f in phase mode), on SB-PLA oriented film (g in topology and h in phase mode), CS-PLA oriented film (i in topology and j in phase mode), on DNA (k in topology and l in phase mode) and on DNA-CSPLA (m in topology and n in phase mode). Scanning scopes: a. and b. 5  $\mu\text{m}$ ; c. and d. 5  $\mu\text{m}$ ; e. and f. 25  $\mu\text{m}$ ; g. and h. 25  $\mu\text{m}$ ; i. and j. 2  $\mu\text{m}$ ; k. and l. 1  $\mu\text{m}$ ; m. and n. 1  $\mu\text{m}$ .



#### 4.1.4 Conclusions

We have presented an easy route for the making a DNA carrier made of PLA and salen. AFM studies on oriented films show differences on arm section of polymers and the PLA part. Finally, the complexation of DNA and CS-PLA are proven by AFM.

#### 4.1.5 Experimental

##### 4.1.5.1 General

All materials (reagents and solvents) were purchased from Laboratoire MAT and Aldrich and used without further purification. Compound characterizations have been performed by  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ NMR using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard in  $\text{CDCl}_3$  on a Brüker ARX 400MHz spectrometer located at the Centre Regional de RMN. by IR-FTIR using a Perkin-Elmer spectrometer, and Elemental analysis was performed by the Laboratoire d'analyse élémentaire of the University of Montreal with a Fisons Instrument, model EA 1108 CHN. The samples were imaged using an AFM Digital Instruments mounted with a Nanoprobe RTESPE7 for mode tapping-air, on mica sheets.

##### 4.1.5.2 Synthesis

*Synthesis of (R,R)-N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-1,2-diaminocyclohexane (1a).* To a solution of potassium carbonate (7 g, 50 mmol) and trans-1,2-diaminocyclohexane (2.6 mL, 21 mmol) in water (20 mL) was added ethanol (65 mL) at room temperature. The resulting mixture was stirred until the reflux temperature (80 °C). A solution of 2,5-dihydroxybenzaldehyde (2.9 g, 21 mmol) and salicylidene (1.7 mL, 21 mmol) in ethanol (30 mL) was then added dropwise to the above reaction mixture. Stirring was continued for 14 h at reflux temperature. After the mixture was cooled to room temperature, the solvent was removed by rotary evaporation. The mixture was extracted four times with ethyl acetate and water. The organic fractions were combined and the

solvent was reduced to few milliliters by rotary evaporation. Then, this solution was added to hexane (1 L) to isolate compound **1a** from the two others. The precipitate was collected to yield 1.52 g of yellow powder (Scheme 1); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3305, 2932, 2857, 1637, 1490, 1272, 1154, 1039, 948 and 794;  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm) 1.5–2.0 (m, 8 H,  $-\text{CH}_2-$ , cyclohexane), 3.3 (m, 2 H,  $-\text{CHR}-$ , cyclohexane), 6.6 (t, 2 H, ArH), 6.8 (d, 2 H, ArH), 7.1 (d, 2 H, ArH), 7.2 (t, 1 H, ArH), 8.2 (s, 2 H,  $-\text{CH}=\text{N}-$ );  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm) 25 ( $-\text{CH}_2-$ , cyclohexane), 34 ( $-\text{CH}_2\text{-CHR}-$ , cyclohexane), 73 ( $-\text{CH}_2\text{-CHR-CHR}-$ , cyclohexane), 117.1 ( $\text{CH-CH-C(OH)-}$  *l*-), 117.4 ( $\text{CR-CH-C(OH)-}$ ), 119 ( $\text{CH-CH-C(OH)}$ external-), 121 ( $-\text{CR}=\text{CHC(OH)-}$ ), 150 ( $-\text{N}=\text{CH}-$ ), 154 ( $=\text{C(OH)-5-}$ ) and 166 ( $=\text{C(OH)}$ internal-); Elemental analysis calculated: C, 71.2%; H, 6.3%; N, 8.3%. Found: C, 71.3%; H, 7.0%; N, 8.7%.

Synthesis of (R,R)-N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-1,2-diaminocyclohexane cobalt (**2**). A reaction flask containing cobalt acetate tetrahydrate (2.4 g, 10 mmol) in ethanol (50 mL) was warmed gently to reflux temperature (80°C). To this warm solution was added drop wise a solution of **1** (1.1 g, 3.2 mmol) in ethanol (25 mL). The reaction mixture was stirred and heated at reflux for 14 h. The mixture was then cooled to ambient temperature, and 500 mL of water is added. The polymer precipitated and was filtered on Büchner to yield 0.94 g (74%) of a red powder (Scheme 1); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3400, 2939, 2359, 1619, 1548, 1438, 1278, 1213, 1028 and 819; Elemental analysis calculated: C, 60.9%; H, 4.8%; N, 7.1%. Found: C, 60.0%; H, 5.6%; N, 5.4%.

*Synthesis of PLA alkene 1% polymer (3).* To remove all water from the reagents, the dilactide (21.5 g, 149 mmol) and the tetraphenyletin (7.7 mg, 0.02 mmol) was dissolved in toluene, then the solvent was removed by rotary evaporation and the reagents were dried under vacuum in the reaction flask. The glycidyl ether (0.36 mL, 3 mmol) was added, warmed and stirred to 180 °C under argon atmosphere for 6 h. After this, the mixture was cooled to ambient temperature. To wash the gum, the mixture was dissolved in 50 mL of ethyl acetate and then 100 mL of water were added. The organic solvent was removed by rotary evaporation and the polymer precipitated in water. The water was thrown out to

obtain the polymer. The mixture was washed three times and dried under vacuum to yield 20.8 g (95%) of a white polymer (Scheme 2);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.5 (m, 3 H,  $\text{CH}_3$ ) and 5.2 (m, 1 H, CH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-D}_6$ )  $\delta$  (ppm) 20 ( $\text{CH}_3$ ), 70 (CH) and 169 ( $\text{C=O}$ ); Elemental analysis calculated: C, 50.2%; H, 5.6%, Found: C, 49.7%; H, 6.0%.

*Synthesis of PLA alcohol 1% polymer (4).* To dissolve PLA alkene (19.9 g, 2.7 mmol), THF (300 mL) was added at 0 °C then 1M  $\text{BH}_3$  in THF (3 mL, 3 mmol) was added. The mixture was stirred for 2 h at 0 °C. Then water (25 mL), 3N NaOH (25 mL) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %, 25 mL) were added. After 1h, water (300 mL) was added. The solvent was removed by rotary evaporation, then the precipitate was washed using the same method described for **3**. The polymer was dried under vacuum to give 14.9g (75%) of a white polymer (Scheme 2);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.5 (m, 3 H,  $\text{CH}_3$ ) and 5.2 (m, 1 H, CH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-D}$ )  $\delta$  (ppm) 20 ( $\text{CH}_3$ ), 70 (CH) and 169 ( $\text{C=O}$ ); Elemental analysis calculated: C, 50%; H, 5.6%, Found: C, 49.4%; H, 5.8%.

*Synthesis of PLA acid 1% polymer (5).* To dissolve **4** (8.4 g, 1.15 mmol), THF (500 mL) was added at 0 °C. Then Jones mixture:  $\text{CrO}_3$  (0.23 g, 2.30 mmol),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.23 mL) and water (0.70 mL) was added in this order. The mixture was stirred for 3 h at 0 °C then isopropyl alcohol (30 mL) and HCl (1N, 500 mL) were added. The solvent was removed by rotary evaporation. The precipitate was washed as described for **3**. The polymer was dried under vacuum to give 7.8g (93%) of white polymer (Scheme 2);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.5 (m, 3 H,  $\text{CH}_3$ ) and 5.2 (m, 1 H, CH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-D}_6$ )  $\delta$  (ppm) 20 ( $\text{CH}_3$ ), 70 (CH) and 169 ( $\text{C=O}$ ); Elemental analysis calculated: C, 50%; H, 5.6%, Found: C, 49.5%; H, 6.0%.

*Synthesis of PLA acyl chloride 1% polymer (6).* A reaction flask containing **5** (2 g, 0.27 mmol) in  $\text{SOCl}_2$  (25mL) was stirred at ambient temperature for 2h. After this time, the solvent was removed by rotary evaporation. The precipitate was collected to give 1.23 g (61%) of white polymer (Scheme 2); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3050, 1750, 1454, 1363, 1350, 1225, 1100 and 867;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.5 (m, 3 H,  $\text{CH}_3$ ) and 5.2 (m, 1 H, CH);  $^{13}\text{C-}$

NMR (DMSO-D<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 20 (CH<sub>3</sub>), 70 (CH) and 169 (C=O); Elemental analysis calculated: C, 49.8%; H, 5.6%; Found: C, 51.1%; H, 5.9%.

Synthesis of PLA-(R,R)-N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-1,2-diaminocyclohexane polymer (7). A reaction flask containing **1a** (3 mg, 0.009 mmol) and **6** (1.5 g, 0.2 mmol) in pyridine (20 mL) is stirred and warmed gently to reflux (115 °C) for 3h. After this time, the mixture is cooled to ambient temperature. To the mixture was added water (50 mL). The precipitated polymer is filtered and collected to give 1.5 g (99%) of white polymer (Scheme 2); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3000, 2980, 1750, 1600, 1450, 1369, 1200, 1188, 1085 and 866; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 1.5 (m, 3 H, CH<sub>3</sub>) and 5.2 (m, 1 H, CH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-D<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 20 (CH<sub>3</sub>), 70 (CH) and 169 (C=O).

Synthesis of PLA-(R,R)-N,N'-bis(2,5-dihydroxysalicylidene)-1,2-diaminocyclohexane cobalt polymer (8). A reaction flask containing **2** (209 mg, 0.5 mmol) and **6** (1.9 g, 0.3 mmol) in pyridine (20 mL) is stirred and warmed gently to reflux (115 °C) for 2h. After 2h, the mixture is cooled to ambient temperature. To the mixture is added water (50 mL). The precipitated polymer is filtered and collected to give 1.5 g (74%) of beige polymer (Scheme 2); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3000, 2980, 1750, 1600, 1450, 1369, 1200, 1188, 1085 and 866; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 1.5 (m, 3 H, CH<sub>3</sub>) and 5.2 (m, 1 H, CH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-D<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 20 (CH<sub>3</sub>), 70 (CH) and 169 (C=O); Elemental analysis calculated: C, 50.5%; H, 5.5%; N, 0.3%. Found: C, 49.1%; H, 5.8%; N, 0.2%.

*AFM study.* AFM was performed on CS-PLA (**8**) and on SB-PLA (**7**), on not oriented and oriented film and on the DNA-CS-PLA complex. To obtain a non-oriented film: dissolve the polymer (0.1 g) with chloroform (5 mL). Place a drop of the polymer solution on mica and wait until complete evaporation of solvent. To obtain an oriented film: dissolve the polymer (0.1 g) in chloroform (5 mL) and add water (5mL) to the polymer solution. At this step, we observe a film at the interface of both layers. Cautiously get the film with the mica sheet to obtain the grafted hydrophilic part on top.

*AFM study of DNA complexed to cationic polymer.* Add calf thymus DNA (0.01 g), having a high polymeric weight, to 400 mM ammonium acetate (50 mL) and 10mM of MgCl<sub>2</sub> (50 mL). Adjust the pH to 7.0 with NaOH. Put a drop of this solution on mica sheet and dry it in oven for 50 minutes. Wash the mica sheet, dip it in a mixture of 50:50 water-ethanol three times then in 100% ethanol to remove salt. Dry it before AFM testing.

*Complexing DNA with cationic polymer.* Dissolve cationic polymer (0.1 g) in chloroform (5 mL). Take DNA solution (2 mL), adjust to pH 7.0 as before and add cationic polymer (2 mL). The resulting solution was vortexed for two minutes and a drop was deposited on a mica sheet. The sample was dried before AFM testing.

#### 4.1.6 References

- (1) Vile, R. G.; Russell, S. J.; Lemoine, N. R. *Gene. Ther.* **2000**, 2-8.
- (2) Okuda, K.; Ihata, A.; Watabe, S.; Okada, E.; Yamakawa, T.; Hamajima, K.; Yang, J.; Ishii, N.; Nakazawa, M.; Okuda, K.; Ohnari, K.; Nakajima, K.; Xin, K. Q. M. *Gene. Vaccine* **2001**, 9, 3681-3691.
- (3) Bonadio, J.; Smiley, E.; Patil, P.; Goldstein, S. *Nat. Med.* **1999**, 5, 753-759.
- (4) Dunlap, D. D.; Maggi, A.; Soria, M. R. *Nuc. Acids Res.* **1997**, 25, 3095-3101.
- (5) Cotton, M.; Wagner, E. *Curr. Opin. Biotech.* **1993**, 4, 705-710.
- (6) Martin, L. Bennink; Dessy, N. Nikova; Kes O. Van Der Werf; Jan G. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 479, 3-15.
- (7) Larrow, J. F.; Jacobsen, E. N. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 1939-1942.

## 4.2 But

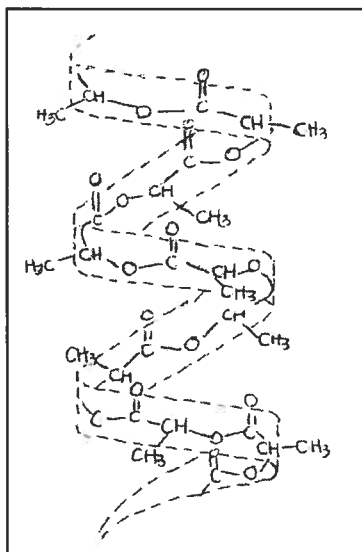
Bien que la conception des polymères greffés biodégradables et biocompatibles ait pour but premier d'y greffer un ligand, il est aussi possible d'utiliser ce type de polymère greffé en thérapie génique en lui greffant un agent cationique tel qu'un métallosalen. L'objectif de cette section a donc pour but de modifier le squelette polymérique du PLA afin de lui conférer les aptitudes nécessaires en vectorisation.

## 4.3 Résultats obtenus et complément d'information

Les résultats obtenus ont été publiés en 2005 dans la revue «Molecules», volume 10, page 105 à 113 sous le titre : AFM study of a New Carrier Based on PLA and salen copolymers for gene therapy. Les auteurs sont : Véronique Nadeau et Patrice Hildgen.

### 4.3.1 La synthèse

La synthèse du PLA greffé se fait en quatre étapes simples. L'utilisation du D-dilactide comme produit de départ ainsi que 1% de 1,2-époxy-3-allyloxypropane conduit à un polymère de structure moléculaire régulière en forme d'hélice (**Figure 52, Page 160**) avec des groupements latéraux.



**Figure 52. Structure du cis-PLA<sup>172</sup>**

La synthèse du greffon se fait en deux étapes, c'est-à-dire qu'il y a d'abord la formation du salen, puis la formation du complexe organométallique plan-carré avec le nickel et tétraédrique avec le calcium, le chrome, le manganèse, le fer, le cobalt, et le cuivre. Par estérification du PLA et du greffon, on obtient un polymère cationique susceptible de se complexer à l'ADN.

#### 4.3.2 L'analyse AFM

L'étude de la surface des polymères par AFM a été effectuée en mode tapping/air sur du mica. Sur l'image de la topologie d'un film de PLA-base de Schiff (PLA-BS) les parties surélevées sont pâles et les parties creuses sont foncées (**Article 3, Figure 1a, Page 153**). On remarque que ce polymère possède une certaine organisation filamenteuse en boule. L'image suivante (**Article 3, Figure 1b, Page 153**) indique les différences de phase. Lorsque la pointe a une affinité pour une partie ou s'il y a une zone qui possède une structure plus flexible, la pointe pénètre profondément la surface. Ces zones sont représentées en couleur foncée dans l'image de phase.<sup>173</sup> Les zones pâles représentent une

structure rigide ou une zone où la pointe possède moins d'affinité pour la surface.<sup>173</sup> Sur cette image, bien que l'on voit des détails qui n'apparaissent pas sur l'image topographique, on remarque que la surface est assez homogène.

Par la suite, nous avons comparé les résultats d'analyse de surface obtenus entre le PLA-salen cationique (PLA-SC) orienté (**Article 3, Figure 1e (topographique) et 1f (phase), Page 153**) et non-orienté (**Article 3, Figure 1c (topographique) et 1d (phase), Page 153**). Pour orienter la surface d'un film, on doit solubiliser le polymère dans le chloroforme, puis ajouter quelques gouttes d'eau sur le dessus de la solution de telle sorte que les parties greffées, qui sont plus hydrophiles que la chaîne de PLA, se retrouvent orientées vers le haut, c'est-à-dire vers la surface aqueuse. L'analyse confirme l'orientation des embranchements puisque l'image en phase indique une concentration élevée de greffons représentée par une surface pâle.

De plus, nous avons comparé les résultats d'analyse de surface obtenus entre le PLA-SC (**Article 3, Figure 1i (topographique) et 1j (phase), Page 153**) et le PLA-BS (**Article 3, Figure 1g (topographique) et 1h (phase), Page 153**). Les deux images en topologie possèdent des zones pâles assez similaires qui représentent les bras de la chaîne de PLA, c'est-à-dire la partie greffée du PLA. Par contre, lorsque l'on compare leur image en phase, on constate que ces mêmes zones sont foncées pour le polymère sans métal et pâles pour le polymère avec le métal. La présence de métaux produit une forme plus rigide sur laquelle la pointe a moins d'affinité que pour la partie greffée ne possédant pas de métal. En quantifiant ces sections en terme de volume occupé, à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image, on obtient 1.7 % de zones foncées sur cette image. Ce qui confirme très approximativement la présence d'environ 1 % de greffons.

Les images topographiques d'un film ADN (**Article 3, Figure 1k (topographique) et 1l (phase), Page 153**) et d'un film d'ADN-SC-PLA (**Article 3, Figure 1m (topographique) et 1n (phase), Page 153**) sont très semblables. Par contre, la taille des fragments diffère. Les particules ADN sont plus petites (50-100 nm) que celles du



complexe ADN-SC-PLA. (100-300 nm). Cette observation peut être expliquée par l'action de complexation du SC-PLA avec le PLA. En mode phase, nous observons que les fragments ADN sont de couleur pâle. Par contre, les fragments homogènes du complexe ADN-SC-PLA en topologie montrent plutôt un caractère hétérogène sur l'image en phase constituée d'un mélange de zones pâles (ADN) et foncées (SC-PLA). Ce comportement est expliqué par une différence de structure chimique qui nous permet de confirmer la complexation entre l'ADN et le polymère.

## 4.4 Résultats complémentaires

### 4.4.1 Absorption atomique

Les PLA-SC ont été analysés à l'aide de l'AA afin de connaître leur teneur en métal. Les résultats obtenus sont relativement près des valeurs théoriques prévues (**Tableau 5, Page 163**). Par contre, ils ne sont pas inclus dans le P(95%). Encore une fois, l'étape finale d'estérification ne possède probablement pas un rendement de 100% mais elle s'y rapproche.

Il est important de noter que le Mn(salen) a aussi été greffé à raison de 1%, 5% et 10%. Nous avons préconisé un faible pourcentage de membres latéraux afin de minimiser l'effet destructeur produit par ceux-ci sur l'hélice formée par la chaîne de (D)-PLA. En effet, l'insertion de groupements latéraux brise légèrement la structure tridimensionnelle régulière du PLA.

**Tableau 5. Dosage des métaux présents sur les polymères de type PLA-métallosalen**

<b>PLA-métallosalen (Article 3, Scheme 2, Page 151)</b>	<b>Longueur d'onde (nm), Type de flamme</b>	<b>Pourcentage en masse théorique de métal (%)</b>	<b>Pourcentage en masse expérimentale de métal (%) et P(95%)</b>
PLA-Ca(salen) <sub>100</sub>	422.7 (Air-acétylène)	Ca = 0.365	Ca = 0.188 ± 0.005
PLA-Fe(salen) <sub>100</sub>	248.3 (Air-acétylène)	Fe = 1.642	Fe = 1.187 ± 0.005
PLA-Cu(salen) <sub>100</sub>	324.8 (Air-acétylène)	Cu = 0.598	Cu = 0.493 ± 0.005
PLA-Ni(salen) <sub>100</sub>	232.0 (Air-acétylène)	Ni = 1.492	Ni = 1.125 ± 0.005
PLA-Co(salen) <sub>100</sub>	240.7 (Air-acétylène)	Co = 0.803	Co = 0.616 ± 0.005
PLA-Mn(salen) <sub>100</sub>	279.5 (Air-acétylène)	Mn = 0.845	Mn = 0.713 ± 0.005
PLA-Mn(salen) <sub>50</sub>	279.5 (Air-acétylène)	Mn = 3.57	Mn = 3.52 ± 0.04
PLA-Mn(salen) <sub>100</sub>	279.5 (Air-acétylène)	Mn = 6.89	Mn = 6.63 ± 0.04

L'étain étant toxique, son utilisation comme catalyseur lors de la polymérisation pose un problème. De plus, étant donné que l'on effectue cinq étapes avant d'obtenir le polymère final, il est plus que probable que l'étain soit complètement enlevé du milieu bien avant d'obtenir le produit final. Afin de nous assurer de son élimination complète, nous avons dosé la quantité présente à chaque étape de synthèse à l'aide de l'AA. Les résultats sont difficilement interprétables puisque même avec la méthode d'ajout dosé et en concentrant au maximum notre échantillon, nous n'obtenons aucune valeur d'étain. Il y a donc deux conclusions possibles. Soit l'étain a complètement été éliminé lors du lavage de l'échantillon, soit l'appareil n'est pas en mesure de détecter une aussi faible quantité. La limite de détection de l'appareil d'AA pour l'étain est de 0.034 mg/L. Sachant que la dose létale 50 des organoétains ( $R_4Sn$ ) chez le rat est de 136-491 mg/kg, il est primordial de déterminer avec précision la teneur en étain présent à l'intérieur des polymères finaux.<sup>174</sup>

Par contre, considérant la limite de détection de l'appareil d'AA, on peut affirmer que la quantité résiduelle qui est indétectable par AA est acceptable.

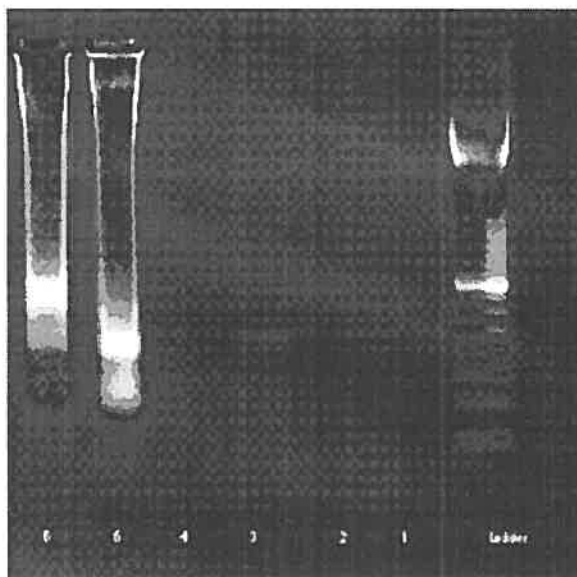
La concentration d'étain aurait pu aussi être déterminée à l'aide du spectromètre à émission de plasma jumelé à un spectromètre de masse (ICP-MS) afin d'obtenir une sensibilité et une limite de détection plus grande et permettre d'affirmer la disparition totale de l'étain. L'utilisation de l'ICP-MS avec une limite de détection plus faible (1-10 ng/L) permettrait d'obtenir des précisions et ainsi de lever le doute sur la présence ou non de ce métal toxique.

D'autres catalyseurs pourraient être envisagés afin d'éliminer complètement les risques de toxicité. La créatinine, par exemple, est un dérivé de la guanidine et participe au processus métabolique de l'arginine. Ce métabolite non-toxique a été récemment exploité avec succès, en tant que catalyseur polymérique du PLA.<sup>175</sup> De plus, certains salicylidènes métalliques de zinc, cuivre, de nickel et de cobalt sont aussi employés en tant que catalyseurs lors de la synthèse de PLA.<sup>176</sup> Il serait donc tout à fait envisageable d'employer nos propres sels métalliques comme catalyseurs lors de la réaction de polymérisation du PLA.

#### 4.4.2 Étude de complexation par électrophorèse sur gel d'agarose

La complexation entre l'ADN et le PLA-SC a été effectuée telle que décrite dans l'article 3, puis étudiée à l'aide de l'électrophorèse sur gel d'agarose. Cette méthode consiste à faire migrer l'ADN sur un gel d'agarose avec du bromure d'éthidium. L'ADN hautement polymérisé est en solution dans un tampon acide éthylènediamine tétracétique (EDTA). On peut le voir migrer dans le puits 5 (**Figure 53, Page 165**). Le polymère SC-PLA est en solution dans de la pyridine; on peut voir qu'il ne migre pas dans le puits 2. Le polymère complexé à l'ADN dans le puits 6 semble migrer moins rapidement que l'ADN seul. Les puits 1, 3 et 4 sont vides. Lorsque le polymère se complexe à l'ADN, il diminue la charge totale et augmente le poids total du complexe formé. Ces deux facteurs sont

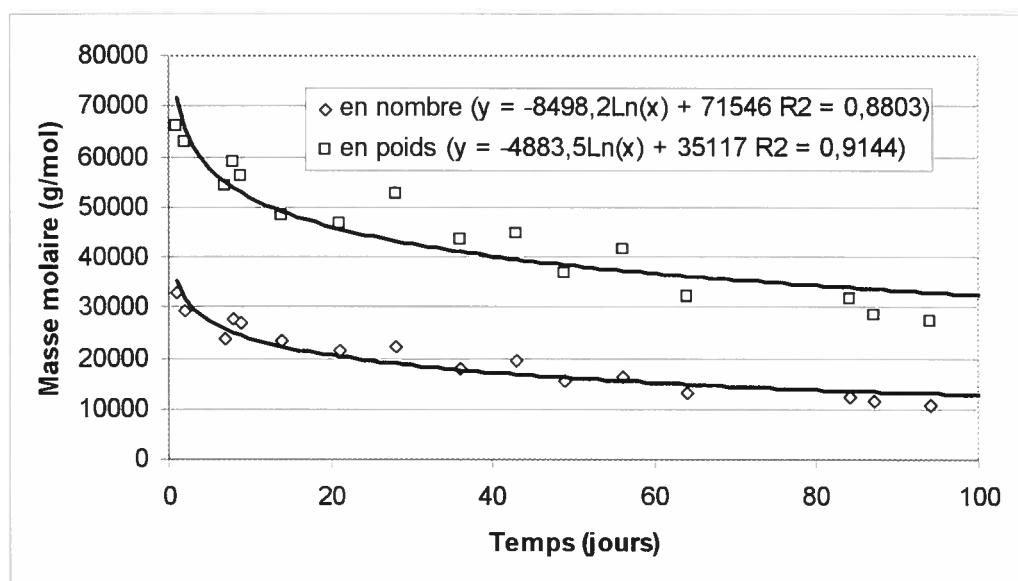
responsables du ralentissement de la migration. Certaines études démontrent que les métallosalens agissent comme des enzymes de restriction.<sup>177</sup> Toutefois, d'après l'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose, l'intégrité de l'ADN ne semble pas affectée lors de sa complexation avec le copolymère.



**Figure 53. Électrophorèse sur gel de d'agarose**

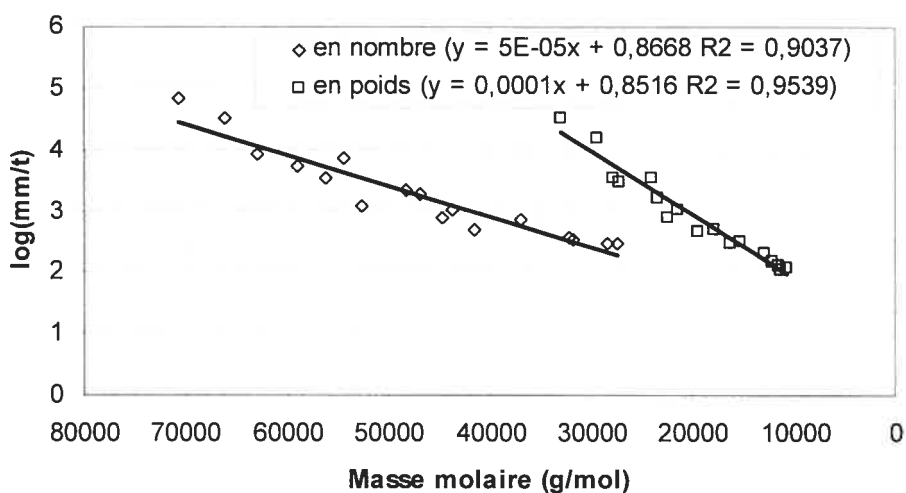
#### **4.4.3 Étude de dégradation**

L'étude de dégradation a été faite sur le (D)-PLA-acide<sub>1%</sub> greffé dans un tampon phosphate à pH 7.4. L'échantillon a été filtré au temps  $t$  et séché sous vide avant l'analyse par GPC. On remarque une diminution des masses molaires moyennes que ce soit en nombre ou en poids (**Figure 54, Page 166**). C'est-à-dire que la dégradation s'effectue d'abord rapidement dans les premiers jours. Par exemple, dans les 15 premiers jours, on observe une chute de la masse molaire en nombre de 50% et de 35% en poids. Par la suite, la dégradation semble ralentir autour d'une masse molaire de 20000.



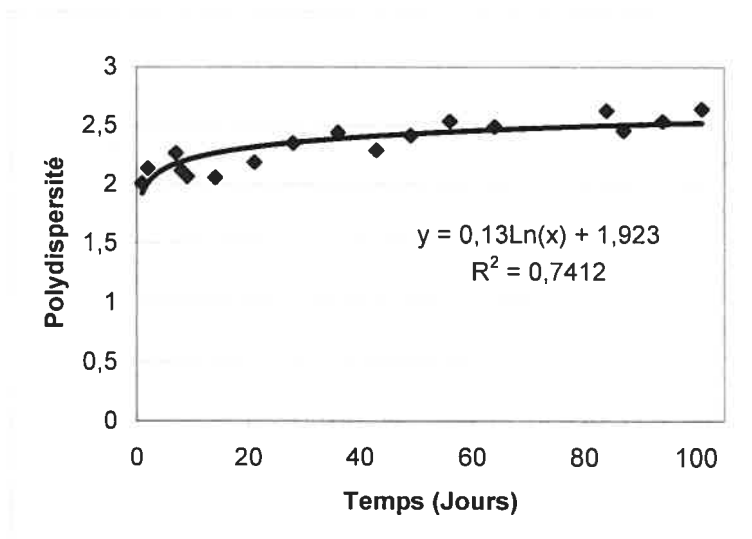
**Figure 54. Étude de dégradation du (D)-PLA-acide<sub>1%</sub>**

La cinétique de dégradation peut être déterminée en traçant le graphique du  $\log(M_n(\text{ou } M_p)/t)$  en fonction de la masse molaire. La régression linéaire d'un tel graphique correspond à l'équation d'une droite linéaire (**Figure 55, Page 167**). La cinétique de la réaction est donc d'ordre 1 avec un indice de corrélation de 0.93.



**Figure 55. Détermination de la cinétique de dégradation du (D)-PLA-acide<sub>1%</sub>**

Dans certains articles sur la dégradation, il est écrit que la polydispersité diminue au tout début.<sup>178,179</sup> Ceci est causé par l'élimination première des plus petites chaînes de PLA (oligomères solubles) et puis, après un certain temps, la polydispersité augmente puisqu'il y a dégradation des grosses chaînes. Dans notre cas, ce phénomène n'est pas observé puisque la polydispersité augmente dès le début (**Figure 56, Page 168**) ce qui semble indiquer que les chaînes de PLA se dégradent de façon aléatoire. Cette étude de dégradation confirme l'hypothèse selon laquelle ces polymères sont dégradables.



**Figure 56. Polydispersité du (D)-PLA-acide<sub>1%</sub>**

#### 4.4.4 Cytotoxicité

L'étude de la cytotoxicité révèle que les PLA greffés sont très peu toxiques même lorsque le milieu contient des concentrations élevées. Le PLA-Fe(salen)<sub>1%</sub> semble pour sa part plus toxique puisque, au-delà de 0.01 mg/mL de polymères, il y a un début de mort cellulaire dans le milieu. L'augmentation de la quantité de salens présents sur le polymère ne semble pas avoir une grande influence sur la toxicité puisque le milieu cellulaire réagit de la même façon pour le PLA-Mn(salen)<sub>1%</sub>, PLA-Mn(salen)<sub>5%</sub> et le PLA-Mn(salen)<sub>10%</sub>.

Le PLA-acide<sub>1%</sub> et le Co(salen) représentent les produits de dégradation possibles du PLA-Co(salen). Bien que le PLA-acide<sub>1%</sub> ne soit pas toxique, le Co(salen) semble toxique aux concentrations supérieures à 0.1 mg/mL. Ce profil de toxicité a aussi été obtenu par le métallosalen 2g (**Article 1, Figure 6, Page 78**). Bien que la plupart des polymères greffés semblent non-toxiques, la quantité de salens présente sur le polymère sera un facteur limitant en milieu biologique puisque, lors de la dégradation, il y aura inévitablement libération de salens métalliques libres.

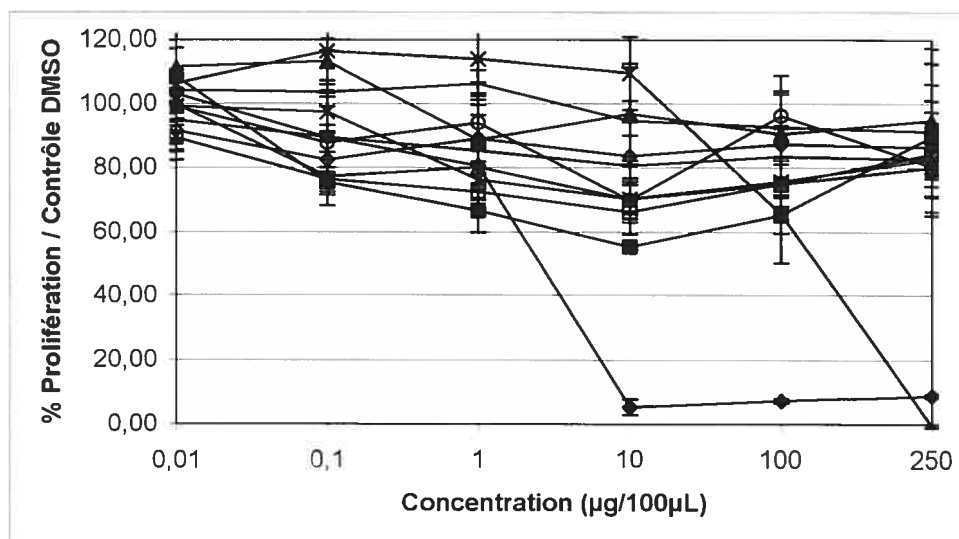


Figure 57. Résultats de la MTT des polymères greffés

PLA-BS<sub>1</sub>% (■), PLA-Co(salen)<sub>1</sub>% (X), PLA-Ca(salen)<sub>1</sub>% (▲), PLA-Cu(salen)<sub>1</sub>% (○), PLA-Ni(salen) (—), PLA-acide (+), PLA-Mn(salen)<sub>1</sub>% (□), PLA-Mn(salen)<sub>5</sub>% (Δ), PLA-Mn(salen)<sub>10</sub>% (◇), PLA-Fe(salen)<sub>1</sub>% (◆) et Co(salen) (\*)

## 4.5 Conclusion

Grâce à des modifications mineures de la structure du PLA réticulé (Article 2, Page 112), de nouveaux polymères biodégradables chargés, susceptibles de se complexer à l'ADN, ont été développés afin de servir de vecteurs de matériel génétique. Une étude effectuée sur ces copolymères confirme le caractère dégradable du PLA-alcool ainsi que la non-toxicité des PLA-SM. L'électrophorèse sur gel d'agarose montre que l'intégrité de l'ADN n'est pas affectée lors de sa complexation avec le copolymère. De plus, une étude à l'aide de l'AFM indique une différence de topologie et de phase, confirmant la complexation entre l'ADN et le copolymère.



## Chapitre 5. Discussion générale

*«Eurêka , telle est, depuis Archimède, la devise du chercheur. Mais que trouve-t-il ?(...) La vraie découverte, celle d'une particule ou d'un théorème inédit, est bien plus rare que la trouvaille d'une amanite des césars ou d'une belle pépite. Pourtant, la très grande majorité des recherches n'est tout simplement pas destinée à découvrir des savoirs de prix (Nobel) : la science « normale » consiste pour l'essentiel à vérifier, raffiner et maîtriser la connaissance déjà acquise.(...) Mais trouver ce que l'on cherche, est-ce vraiment trouver ? Certainement pas au point de jaillir tout nu de sa baignoire en hurlant. Rares sont les moments de gloire où la science admise touche ses limites et où se dévoile un nouvel horizon.»*

***Impasciences, Jean-Marc Levy-Leblond (Seuil)***

## 5.1 Polymères conducteurs en régénération tissulaire

L'objectif général de cette section était d'effectuer la synthèse de biomatériaux à base de métallosalens pour la régénération tissulaire. Cet objectif implique que la structure soit biodégradable, biocompatible et conductrice. Les hypothèses posées alors étaient que les liaisons ester du polymère assurent la biodégradation, les métallosalens ainsi que le PLA assurent la biocompatibilité et, finalement, que les métallosalens, la chaîne aliphatique et téréphthaloïque permettent une certaine conductivité. Reprenons chacune de ces hypothèses et regardons si les résultats expérimentaux obtenus abondent en ce sens.

### *a) Synthèses et caractérisations structurales :*

Pour effectuer la synthèse des bases de Schiff, nous avons choisi d'utiliser l'éthanol comme solvant ainsi que du carbonate de potassium comme agent déshydratant. La purification s'effectue à l'aide d'une extraction (acétate d'éthyle/eau). La caractérisation par RMN, IR, spectrométrie de masse et analyse élémentaire confirme les structures obtenues.

La complexation des salicylidènes est basée sur la quatrième voie de synthèse illustrée à la figure 2 (**Page 4**). La caractérisation par RMN et IR confirme les structures obtenues. L'analyse élémentaire démontre la présence de molécules d'eau chélatées sur certains métaux. L'analyse enthalpique différentielle des métallosalens nous permettrait ultérieurement de confirmer la formation des hydrates métalliques.

À l'aide de la théorie du champ cristallin, nous avons déterminé la structure tridimensionnelle de ces différents complexes. Les structures métallosalens à base de Cu(II) ont une géométrie plan-carré tandis que celles des complexes Zn(II) ainsi que des complexes Mn(II) ont une géométrie tétraédrique. Ceci pourrait être confirmé expérimentalement par analyse cristallographique des rayons X.

Suite à la purification, les métallosalens obtenus n'ont pas d'acétate coordonné au centre métallique. Un stagiaire effectue présentement la complexation des bases de Schiff avec la cinquième voie de synthèse (**Figure 2, Page 4**). Par cette voie de synthèse, la complexation s'effectue en présence du chlorure métallique correspondant afin de produire un salen semblable au Euk-134 (**Figure 17, Page 20**) mais avec deux groupements alcool externe et sans groupement méthyle en position ortho. Cette nouvelle structure possèdera peut-être une activité catalytique biologique semblable au Euk-134. Avec ces nouvelles structures, nous envisageons la possibilité d'effectuer une étude comparative sur l'activité catalytique biologique des salens(II) versus les salens(III). De plus, il serait intéressant de comparer la conductivité relative des salens(II) à celle des salens(III). Les résultats de ces études ne sont pas présentés dans cette thèse.

Par ailleurs, le chapitre 2 décrit la synthèse des polymères linéaires par estérification de différents diacides tels que l'acide téréphthalique et l'alcane dioïque. Encore une fois, la caractérisation par RMN, IR et l'analyse élémentaire confirme les structures obtenues ainsi que la présence de molécules d'eau chélatées au centre métallique. La chromatographie par perméation de gel indique une masse molaire variant de 31 000 à 58 000 g/mol.

La synthèse du (DL)-PLA-SM réticulé s'effectue par la réaction, à la température de fusion, du (DL)-dilactide et du 1,2-époxy-3-allyloxypropane, en présence d'une quantité catalytique de  $\text{SnPh}_4$ . Par la suite, le polymère subit une réaction d'hydroboration-oxydation pour conduire à l'alcool correspondant qui est ensuite oxydé à l'aide du réactif de Jones en son dérivé acide carboxylique (**Figure 39, Page 100**). Ce dernier, par réaction avec le chlorure de thionyle, conduit à l'intermédiaire chlorure d'acide sur lequel est greffé une autre molécule telle qu'un métallosalen. La caractérisation par RMN, IR et par l'analyse élémentaire confirme les structures obtenues. La chromatographie par perméation de gel indique une masse molaire moyenne de 10 000 g/mol.

Toutes ces synthèses se sont avérées efficaces, simples, rapides et reproductibles. Un problème récurrent tout au long de ces recherches fut l'utilisation de la RMN. Sachant que la RMN standard ne peut se faire sur les composés organométalliques, l'emploi de RMN spécialisé à l'analyse des métaux est donc nécessaire afin de caractériser complètement ce type de molécule. Comme il n'a pas été possible d'utiliser la RMN spécifique aux métaux, nous avons contourné le problème en utilisant un modèle de SM constitué de zinc. Les métalloalènes à base de zinc peuvent être analysés en RMN puisqu'ils ne possèdent pas d'électron non-pairé (paramagnétique) susceptible de brouiller le signal. Par contre, il serait préférable de compléter la caractérisation en utilisant une méthode de caractérisation spécifique aux métaux.

De plus, les polyesters linéaires co-aliphatiques et co-téréphtaliques sont très peu solubles en raison de leurs masses molaires élevées. La RMN du solide pourrait aussi servir à caractériser les polyesters-co-téréphtaliques. Par contre, l'insolubilité de ces polymères risque de limiter grandement leur utilisation puisqu'aucun solvant ne semble solubiliser complètement ces polymères.

### ***b) Caractérisations chimiques***

La température de transition vitreuse ( $T_g$ ) correspond à la température à laquelle le polymère passe de l'état vitreux à l'état caoutchoutique. La température de transition vitreuse dépend de la rigidité de la chaîne polymère (une chaîne rigide aura une  $T_g$  haute, une chaîne souple aura une  $T_g$  basse), de la taille des groupements latéraux (des groupements latéraux grands vont être des obstacles au glissement des chaînes et donc donner un polymère de haute  $T_g$ ) et la force des interactions intermoléculaires (des interactions fortes donnant une haute  $T_g$ ).<sup>171</sup>

L'analyse thermique des polyesters de salens linéaires indique une  $T_g$  élevée ( $150 \pm 10$  °C). Cette  $T_g$  élevée peut être attribuable à la rigidité des chaînes (nombreuses structures aromatiques) et aux nombreuses interactions intermoléculaires possibles.

De la même manière, l'analyse thermique des (DL)-PLA-SM réticulés indique une  $T_g$  variant de 43 à 52 °C, ce qui est légèrement inférieur à la  $T_g$  du (DL)-PLA (57 °C). Le faible taux de réticulation (1%) est probablement insuffisant pour augmenter la rigidité de la structure. La seule raison plausible à cette diminution de la  $T_g$  serait que les interactions intermoléculaires sont défavorisées par la structure métallosalen réticulée.<sup>171</sup>

L'analyse thermogravimétrique confirme la stabilité thermique de tous les polyesters de salen puisque la température de décomposition des polymères linéaires et celle des polymères réticulés s'échelonne respectivement de 200 à 1000 °C et de 275 à 1000 °C. L'analyse thermogravimétrique des PLA-SM réticulés ainsi que des polymères linéaires indique la présence d'eau vers 100 °C initiant l'hydrolyse en bout de chaîne des liaisons esters.

Le caractère semi-cristallin des polyesters de salens linéaires ainsi que des PLA-SM réticulés a été confirmé à l'aide du microscope polarisant et de l'AFM. La diffraction des rayons X permet de connaître l'organisation de la matière en nous donnant accès à des informations physiques sur les cristaux, notamment leur taille et leur orientation. Afin de bien caractériser ces polyesters semi-cristallins, la diffraction des rayons X serait souhaitable. Finalement, le caractère hydrophobe des biomatériaux (polymères réticulés et linéaires de métallosalens) a été démontré par l'analyse de l'angle de contact.

### ***c) Dégradation***

La structure polymérique doit être pensée pour être biodégradable et biocompatible. Les structures développées au chapitre deux se doivent aussi d'être biorésorbables après dégradation pour une aide temporaire puisque ces dernières sont requises pour une durée limitée : le temps de la guérison. La notion d'aide thérapeutique temporaire repose sur la capacité des systèmes vivants à s'autoréparer. Nous n'avons pas de données sur la dégradation des polymères linéaires. De plus, ces polymères se sont avérés faiblement solubles dans tous les solvants. L'une des conséquences de cette faible solubilité est la difficulté d'analyse des masses molaires moyennes par GPC. Malgré plusieurs tentatives, l'analyse par spectrométrie de masse n'a pas donné de résultats. La LC-MS aurait pu nous fournir de précieuses informations sur les produits de dégradation et, ainsi, confirmer que les liaisons esters sont bel et bien responsables de la dégradation. Malheureusement cette étude, qui nécessite un appareillage sophistiqué, n'a pas non plus donné de résultats.

Une étude sur la dégradation du (D)-PLA-acide greffé a été décrite au chapitre quatre et démontre le caractère dégradable de cette structure. Bien qu'aucune étude de dégradation n'ait été effectuée sur les (DL)-PLA-salens réticulés, on peut déduire que ceux-ci seront tout autant dégradables puisque, tel que décrit dans l'introduction, le (DL)-PLA est amorphe et se dégrade plus rapidement que le (D)-PLA. Toutefois, la présente recherche n'apporte aucune preuve pour appuyer cette hypothèse mais de nombreux travaux vont en ce sens.<sup>180</sup>

### ***d) Biocompatibilité***

Préalablement à l'analyse de la biocompatibilité, les valeurs de l'angle de contact d'une goutte d'eau sur les polyesters conducteurs 4a, 4d, 4f et (DL)-PLA-2l indiquent que l'adhésion cellulaire serait favorisée. Ce qui est un bon présage pour la biocompatibilité. La biocompatibilité *in vitro* des quatre polymères conducteurs a par la suite été analysée et l'étude *in vitro* de la cytotoxicité nous confirme la non-toxicité des polymères linéaires

ainsi que de leurs produits de dégradation probables (métallosalens 2g, 2j, 2l, acide téréphtalique) aux concentrations inférieures à 0.1 mg/mL. Selon l'analyse MTT, au-delà de cette concentration, le métallosalen 2g commencerait à être toxique. D'un autre côté, l'analyse LDH n'indique pas de toxicité même à des concentrations supérieures (0.250 mg/mL). C'est donc dire que si le métallosalen 2g est toxique aux concentrations supérieures à 1 mg/mL, il ne l'est que très peu. Si toxicité il y a, celle-ci pourrait être causée par la présence de solvant résiduel. La chromatographie gazeuse permettrait de détecter le solvant résiduel.

La cytotoxicité *in vitro* (MTT et LDH) des (DL)-PLA-SM réticulés et du (DL)-PLA a aussi été effectuée et ces produits s'avèrent non-toxiques. Les résultats des premières analyses de cytotoxicité *in vitro* sont tout de même acceptables et nous amènent à confirmer l'hypothèse selon laquelle les polymères linéaires 4a, 4d et 4f ainsi que le polymère réticulé (DL)-PLA-2l sont biocompatibles. Notons toutefois que la limite de toxicité est de 0.1 mg/mL.

De plus, on peut aussi se poser la question suivante : les cellules croissent-elles de façon uniforme ou préfèrent-elles se regrouper ensemble afin de minimiser leur contact avec la surface polymérique? La réponse à cette question nous permettrait de mieux définir la biocompatibilité des polymères.

#### ***e) Conductivité***

L'éventuelle efficacité des polyesters de salen en régénération tissulaire repose sur la capacité que possède la structure de permettre le transport de charges. La conductivité de ces copolymères devrait donc être assurée, d'une part, par une structure polymérique conjuguée et, d'autre part, par la présence de métallosalens. La relation structure-conductivité des polymères nous permet de tirer quelques renseignements.

**Tableau 6. La conductivité des différents polymères**

<b>Polysters linéaires</b> <b>(Figure 34, Page 92)</b>	<b>Conductivité (S/cm)</b>	<b>PLA-(SM) réticulés</b> <b>(Figure 40, Page 101)</b>	<b>Conductivité (S/cm)</b>
3a	2,2 E-9	PLA-2a réticulé	1.4 E-9
3b	6,0 E-10	PLA-2b réticulé	3.6 E-08
3c	1,6 E-8	PLA-2c réticulé	5.8 E-10
3d	2,3 E-8	PLA-2d réticulé	8.8 E-10
3e	1,7 E-7	PLA-2e réticulé	1.2 E-9
3f	3,0 E-8	PLA-2f réticulé	7.4 E-10
4a	1,0 E-5	PLA-2g réticulé	1.3 E-9
4b	2,8 E-9	PLA-2h réticulé	1.5 E-9
4c	4,6 E-9	PLA-2i réticulé	6.0 E-9
4d	1,2 E-4	PLA-2j réticulé	1.2 E-9
4e	6,2 E-10	PLA-2k réticulé	6.2 E-10
4f	3,0 E-5	PLA-2l réticulé	4.0 E-6

Certains polymères linéaires *co*-téréphtaliques semblent prometteurs grâce à leur meilleure capacité à conduire l'électricité comparativement aux polymères linéaires *co*-aliphatiques. Le type de transport de charges peut être la cause de cette différence de conductivité. La conductivité des polymères aliphatiques s'effectue de façon linéaire entre les liaisons conjuguées de type  $\pi$  intramoléculaire. De façon analogue, les électrons conjugués des polymères téréphtaliques peuvent voyager à l'intérieur d'une même molécule. Toutefois, leur structure permet la délocalisation intermoléculaire puisqu'il y a superposition des cycles aromatiques.<sup>66,67</sup> Pour appuyer cette hypothèse, il serait possible d'effectuer la synthèse de polymères linéaires *co*-succiniques. Ces nouveaux polymères permettraient d'éclaircir la nature de la conductivité obtenue puisque, si la conductivité est



semblable à celle des polymères *co*-téréphtaliques, la délocalisation entre les cycles aromatiques n'est pas en cause.

Il se pourrait que les chaînes aliphatiques ainsi que les chaînes polymériques de PLA soient trop longues pour permettre une délocalisation optimale des électrons intrachânes. La faible concentration de SM présent sur les polymères réticulés peut aussi être la cause des faibles valeurs de conductivité. Augmenter la teneur en SM et diminuer la longueur de la chaîne aliphatique serait donc une solution pour augmenter ce type de conductivité. Pourtant, les résultats de la conductivité indiquent qu'un des polymères réticulés (PLA-2I) est un semi-conducteur puisqu'il conduit faiblement l'électricité ( $10^{-6}$  S/cm, **Tableau 6, Page 177**). La délocalisation intrachaine n'étant pas favorisée par la longueur des chaînes et la faible teneur en SM, le transfert de charges s'effectue probablement par délocalisation interchaîne et interdomaine. Le caractère réticulé de ce polymère favorise ces deux types de délocalisation en réduisant la distance entre les chaînes polymériques.<sup>181-183</sup> L'augmentation de la teneur en métallosalen permettrait d'augmenter le taux de réticulation, de diminuer la délocalisation intramoléculaire ainsi que d'augmenter la délocalisation interchaîne et interdomaine conduisant probablement à une conductivité encore plus élevée.

Il est intéressant de noter que le polymère linéaire *co*-téréphtalique 4f (**Figure 34, Page 92**), est composé du même métallosalen que le PLA-2I. Ces deux polymères possèdent une conductivité supérieure aux autres. Ce métallosalen possède une structure légèrement différente, ce qui lui permet d'être greffé par les phénols dans la région supérieure des métallosalens. Cette particularité pourrait être la cause de cette conductivité marquée. Cette hypothèse reste à confirmer. On remarque que, même lorsqu'il est présent en faible quantité dans une structure de PLA, le métallosalen 2I confère au polymère un caractère conducteur.

De plus, il serait bon d'étudier la conductivité des polymères linéaires *co*-aliphatiques et les polymères PLA réticulés lorsque leur structure est orientée. La technique

de l'électrospray pourrait, par exemple, permettre d'orienter les chaînes sous l'action d'un champ magnétique. Ceci pourrait nous révéler beaucoup d'informations sur la relation structure-conductivité de ces nouveaux matériaux.

Suite à cette analyse, la majorité des polyesters de salen analysés ont démontré une conductivité inférieure à  $10^{-8}$  S/cm et sont donc des matériaux isolants. Les changements de conductivité ne sont pas significatifs d'un polymère isolant à l'autre. Par contre, quatre polymères (**polymères 4a, 4d, 4f et PLA-2l, Tableau 6, Page 177**) ont obtenus une conductivité légèrement supérieure et propre aux matériaux semi-conducteurs avec une conductivité se situant entre  $10^{-7}$  et  $10^{-1}$  S/cm. L'hypothèse selon laquelle la conductivité de ces copolymères est assurée par une structure polymérique conjuguée et par la présence de métallo-salens n'est pas confirmée.

En terminant, la synthèse et la caractérisation de polymères semi-cristallins chargés basées sur des salicylidènes ont été rapportées, et les caractérisations structurales ont validé les structures proposées. Le caractère hydrophobe, les propriétés de conductivité et la stabilité thermique ont été déterminés. La biocompatibilité a été étudiée *in vitro*, et des résultats prometteurs ont été exposés. L'article 1 ainsi que les résultats présentés au chapitre deux contribuent au développement d'une nouvelle famille de polymères chargés biodégradables. Trois copolymères basés sur l'acide téréphtalique ainsi qu'un polymère réticulé ont présenté des propriétés conductrices significatives. Ces polymères conducteurs sont développés dans l'espoir de servir de biomatériaux en sciences médicales. Évidemment, beaucoup de travail reste à faire avant d'atteindre ce but mais nos travaux de recherche prouvent que nous sommes sur la bonne voie. Suite à une analyse en profondeur de la biodégradation et de la cytotoxicité, ces polymères conducteurs pourront éventuellement être utilisés pour la régénération d'os et de nerfs.<sup>184</sup> Ils pourraient aussi être impliqués dans la vectorisation ciblée de gènes, la complexation et le relargage d'ADN.<sup>154,185</sup> Finalement, nous avons vu en introduction que certains salens peuvent conférer des activités enzymatiques aux polymères (en tant que mimétique de la catalase et

de la SOD).<sup>57</sup> Par conséquent, il est probable que ces polymères favorisent l'élimination de radicaux libres, sous forme de supports fonctionnalisés ou en tant qu'enduits antioxydants sur les dispositifs prosthétiques.<sup>186</sup>

## 5.2 Conception de polymères greffés

Tirant profit des propriétés physiques ainsi que du caractère biodégradable et bioassimilable du PLA et du PLGA, de nombreuses applications médicales pour usage chirurgical et pharmacologique ont été considérées. La communauté scientifique s'intéresse de plus en plus aux polymères biodégradables et bioassimilables et cherche des méthodes de synthèse reproductible qui permettent de contrôler la structure des polymères obtenus. Nous joignons nos efforts à cette fin en proposant, au chapitre trois, des structures greffées à base de PLA, de PCL et de PGLY.

### *a) Synthèses et caractérisations*

Les synthèses du PLA, de la PCL, de la PGLY ainsi que du PLA-PGLY greffé ont été effectuées à l'aide de 1,2-époxy-3-allyloxypropane par ouverture de cycle. Par la suite, les fonctions allyles des embranchements créés par l'époxyde ont été transformées en alcool, en acide, puis en chlorure d'acide afin de permettre l'addition de différentes molécules dont l'alcool benzylique susceptible d'aider la caractérisation structurale. Les polymères ainsi obtenus ont été caractérisés par IR, RMN-<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C, analyse élémentaire, GPC et DSC. Les spectres RMN confirment la formation de polymères greffés. L'étape de synthèse déterminante est la polymérisation par ouverture de cycle puisque de cette étape dépendra la structure finale du polymère. Revoyons donc, plus spécifiquement, ce dont il s'agit.

Les polyesters peuvent être obtenus par condensation d'unités monomériques tel que l'acide lactique ou à l'aide de la polymérisation par ouverture de cycle (POC) du dimère cyclique correspondant. L'eau libérée lors de la polycondensation est difficile à

enlever et, par conséquent, limite la masse molaire du polymère. Cette limitation peut être évitée à l'aide du processus de distillation azéotropique breveté par Mitsui Toatsu Chemicals Inc.<sup>187</sup> Toutefois, la POC permet un meilleur contrôle de la polymérisation et reste, de loin, la méthode la plus répandue pour la synthèse des matériaux polymériques. Nos recherches sont motivées par la perspective de contrôler la synthèse des polyesters et de permettre leur reproductibilité. C'est pourquoi, au chapitre trois, nous avons choisi d'effectuer la polymérisation par la méthode d'ouverture de cycle.

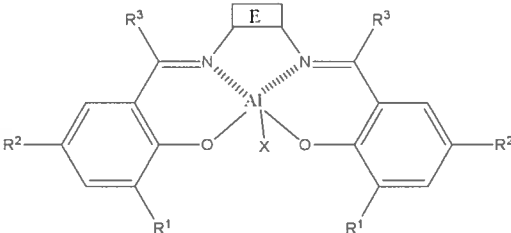
La POC requiert l'utilisation d'un catalyseur afin d'obtenir des conditions réactionnelles propices à la polymérisation d'esters cycliques. En 1950, Kleine et al. ont été les premiers à s'intéresser aux catalyseurs métalliques.<sup>188</sup> Depuis, une large gamme d'initiateurs ont été évalués en fonction de la nature du centre métallique et de ses ligands environnants.<sup>189</sup> L'étude structurale de ces complexes métalliques a contribué à une meilleure compréhension des facteurs qui régissent la polymérisation. Des améliorations spectaculaires de l'activité catalytique et du contrôle de la polymérisation ont été réalisées.

La copolymérisation par ouverture de cycle d'acide lactique et d'acide glycolique produit des polymères égaux, ou au moins proportionnels, au ratio molaire initial.<sup>190</sup> C'est ce que nous nous sommes appliqués à prouver au chapitre trois à l'aide d'étude RMN. Les résultats RMN confirment que la copolymérisation par ouverture de cycle du 1,2-époxy-3-allyloxypropane avec le lactique ou l'acide glycolique produit des polymères proportionnels au ratio molaire initial. Par contre, l'énergie nécessaire à l'ouverture de cycle du caprolactone (629 kJ/mol) est inférieure à celle de l'époxyde (966 kJ/mol) ce qui diminue l'efficacité de l'insertion de ce dernier à la structure polymérique du caprolactone.

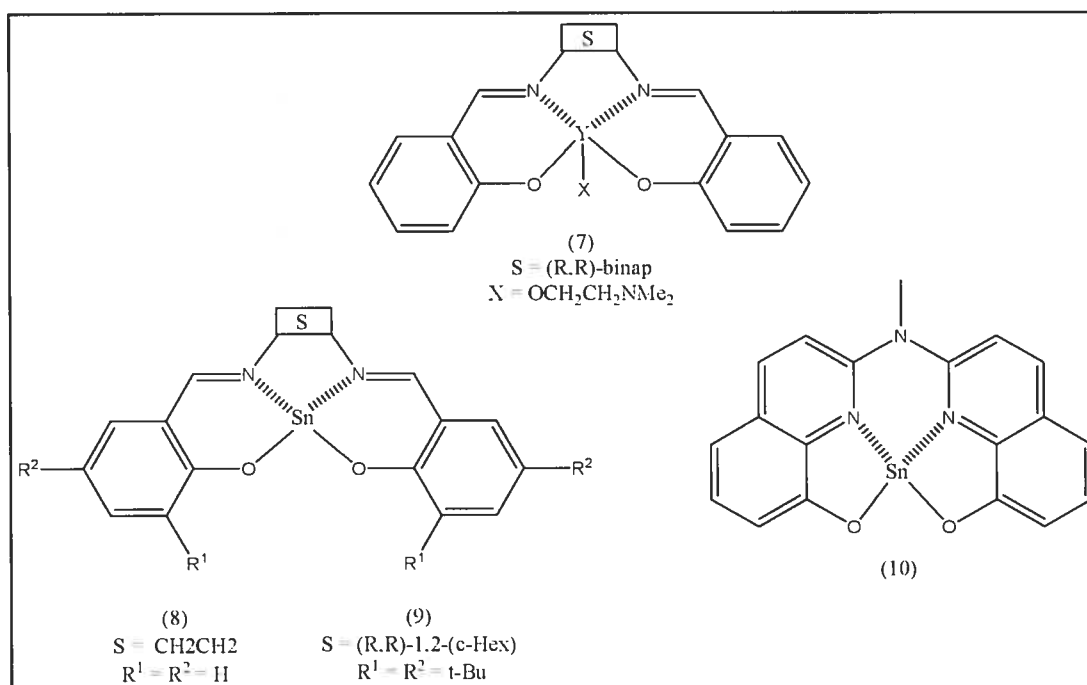
Tel qu'énoncé dans l'introduction, les ligands de type salen possèdent une structure analogue aux porphyrines et peuvent être employés comme catalyseurs chimiques lors de réactions d'ouverture de cycle. Inspirés par le travail d'Inoue et de ces collègues, plusieurs groupes de recherche ont étudié les complexes d'aluminium chélatés à un salen (**Tableau 7, Page 177**).<sup>191-206</sup> Tous les complexes du tableau précédent se sont avérés actifs pour la

polymérisation du lactide, sans période d'induction, avec un taux de conversion élevé, typiquement obtenu après quelques jours à 70 °C en présence de toluène avec un rapport monomère-initiateur autour de 100. Dans la plupart des cas, la distribution étroite de la masse molaire indique que la polymérisation est bien contrôlée. L'activité marquée des complexes à base de salen peut être attribuée au site unique de propagation de l'espèce, à la géométrie de ces complexes et à la flexibilité relative des ligands de type base de Schiff comparativement aux porphyrines.

**Tableau 7. Complexes Al(salen) employés comme catalyseurs chimiques lors de réactions d'ouverture de cycle**

						
complexe	espaceur E	X	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	références
1a	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	OMe	H	H	H	191-193
1b	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	OMe	H	Cl	H	194
1c	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	OMe	H	H	Me	195,196
1d	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	Oi-Pr	H	H	Me	196
1e	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	Oi-Pr	H	Cl	H	196
2a	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	Et	H	H	H	197
2b	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	Et	Me	Me	H	197
2c	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	Et	i-Pr	H	H	197
2d	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	Et	Ph	H	H	197
2e	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	Et	t-Bu	t-Bu	H	197
3	1,2-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Oi-Pr	H	Cl	H	196
4a	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	Et	H	H	H	197
4b	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	Et	Me	Me	H	197
4c	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	Et	i-Pr	H	H	197
4d	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	Et	Ph	H	H	197
4e	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	Et	t-Bu	t-Bu	H	198
5a	(R,R)-1,2-(c-Hex)	Oi-Pr	t-Bu	t-Bu	H	199,200
5b	rac-1,2-(c-Hex)	Oi-Pr	t-Bu	t-Bu	H	199,200
6a	(R,R)-binap	Et	H	H	H	201
6b	(R,R)-binap	OMe	H	H	H	201
6c	(R,R)-binap	Oi-Pr	H	H	H	202-205
6d	(S,S)-binap	Oi-Pr	H	H	H	205
6e	rac-binap	Oi-Pr	H	H	H	206

Bien que la plupart des complexes à base de salen qui aient été étudiés pour l'ouverture de cycle des lactides sont constitués d'aluminium, des complexes de zinc, de cuivre, de nickel, de cobalt, d'yttrium et d'étain ont été également rapportés (**Figure 58**).<sup>176</sup> En dépit de sa structure dimère, le dérivé de yttrium (**Figure 58, Complexe 7**) s'est avéré plus actif que le complexe d'aluminium correspondant (**Figure 58, Complexe 6c**) pour une concentration initiale en monomère de 0.2 moles L<sup>-1</sup> et un rapport lactide-catalyseur de 100. À 70°C en présence de toluène, une conversion de 97% a été obtenue après seulement 14 h avec le complexe d'yttrium (**Figure 58, Complexe 7**) comparativement à 40 h avec le complexe d'aluminium (**Figure 58, Complexe 6c**).<sup>204</sup> L'activité des complexes constitués d'étain (**Figure 58, Complexes 8, 9 et 10**) n'a pas encore été prouvée.<sup>207</sup>



**Figure 58. Quelques catalyseurs chimiques à base de salen en développement**

En tenant compte de toutes ces caractéristiques, il serait intéressant d'évaluer l'activité catalytique chimique des salens métalliques synthétisés dans cette thèse pour la réaction d'ouverture de cycle. En reproduisant la polymérisation du PLA, du PCL, du

PGLY et du PLA-PLGY greffé aux différents métallosalens telle que décrite au chapitre quatre, il serait possible de comparer leur activité catalytique chimique en fonction des différents métaux et des différents substituants.

#### ***b) Biocompatibilité***

L'analyse MTT et LDH *in vitro* des PLA, PCL, PGLY et PLA-PGLY greffés confirme que ces polymères ne sont pas toxiques. Ces analyses indiquent que ni la quantité de groupements latéraux, ni la transformation des embranchements n'affectent la toxicité des polymères, ce qui est un bon présage pour de futures applications en tant que biomatériaux.

#### ***c) Dégradation***

Une étude sur la dégradation du (D)-PLA-acide greffé démontre le caractère dégradable de cette structure. Bien qu'aucune étude de dégradation n'ait été effectuée sur les (DL)-PLA greffés, on peut déduire que ceux-ci seront tout autant dégradables. Aucune étude sur la dégradation des PCL, des PGLY et des PLA-PGLY n'a été effectuée mais de nombreux autres chercheurs confirment leur caractère biodégradable.<sup>180,208</sup>

#### ***d) Autres développements possibles***

Tel que décrit au chapitre deux, l'étude d'implants constitués de polymères biorésorbables suscite beaucoup d'intérêt. Les implants polymériques biorésorbables possèdent plusieurs avantages sur les implants métalliques puisqu'ils ne subissent pas de corrosion et ne nécessitent pas de chirurgie après réparation des tissus.<sup>209-211</sup> Des recherches récentes traitent de l'utilité des PLA, des PCL et des PGLY en régénération tissulaire pour l'os et le cartilage ou la formation de nouvelle peau.<sup>212-214</sup> Des implants formés de PLA, de PCL et de PGLY pourraient être amenés à remplacer les implants métalliques dans le futur. Il serait donc intéressant de développer des structures réticulées ou greffées de PCL et de PGLY munies de SM afin d'étudier, tout comme je l'ai fait au chapitre deux avec les PLA-



SM réticulés et les polymères linéaires, le caractère conducteur de ces structures ainsi que de la possibilité de les employer en régénération tissulaire.

### **5.3 Utilisation des polymétallosalens greffés en thérapie génique**

L'objectif général de cette section est d'effectuer la synthèse de copolyesters branchés à base de salen pour la thérapie génique. Cet objectif implique que la structure soit biodégradable, biocompatible et capable de se complexer à l'ADN. Les hypothèses énoncées dans l'introduction sont les suivantes : les liaisons esters du polymère permettent la biodégradation ainsi que les SM et le PLA sont biocompatibles. De plus, on pose l'hypothèse que les salens, par leur caractère cationique, pourraient se lier aux liaisons phosphates chargées négativement de l'ADN et ainsi servir de vecteurs en thérapie génique.

#### ***a) Synthèses et caractérisations***

La synthèse et la caractérisation structurale s'effectuent à l'aide des mêmes étapes de synthèse et des mêmes techniques chimiques que celles décrites et discutées précédemment. Par ailleurs, les résultats obtenus sont en tous points semblables. La seule modification au protocole de l'article 2 est l'utilisation du cis-dilactide à la place du (DL)-dilactide afin d'adapter la structure tridimensionnelle à la complexation de l'ADN.

#### ***b) Dégradation***

Les liaisons esters permettent-elles la dégradation du polymère? La dégradation des polyesters aliphatiques dérivés de l'acide lactique est un processus très complexe qui dépend de nombreux paramètres décrits dans l'introduction. Les plus importants sont la morphologie, la composition chimique, la structure configurationnelle, la masse molaire moyenne, la taille et les caractéristiques du milieu de dégradation (température, pH, force ionique). La compréhension des subtilités de la dégradation de ces polyesters ouvre la voie

à de nouveaux travaux ayant pour but de maîtriser les nombreux facteurs qui peuvent affecter les propriétés et les comportements des systèmes macromoléculaires. Les résultats obtenus confirment le caractère dégradable de la structure polymérique faite de (D)-PLA. Par contre, les produits de dégradation n'ont pas été identifiés. Nous ne pouvons donc pas, à ce stade, confirmer que ce sont les liaisons esters qui assurent la dégradation mais de nombreux autres auteurs l'ont fait.<sup>180</sup>

### *c) Cytotoxicité*

Les métallosalens, le PLA ainsi que le PGLY assurent-ils la biocompatibilité des (D)-PLA-SM greffés? Cette hypothèse est partiellement confirmée puisque, selon l'étude *in vitro* de cytotoxicité, les métallosalens, le (D)-PLA, le (D)-PLA-SM greffé ainsi que le PGLY greffé se sont avérés non-toxiques aux concentrations inférieures à 0.1 mg/mL. Aux concentrations supérieures à 0.1 mg/mol, le Co(salen) ainsi que le PLA-Fe(salen) ont démontré une forte toxicité. Seuls des tests *in vivo* valideront complètement cette hypothèse.

### *d) Complexation*

Les SM assurent-ils la complexation du polymère? Une étude comparative à l'aide de l'AFM en mode contact intermittent a été effectuée sur les copolymères SC-PLA par rapport à des copolymères non chargés constitués de PLA et de base de Schiff (BS-PLA) et sur les complexes ADN SC-PLA. Les résultats indiquent une différence de topologie et de phase, confirmant la complexation entre l'ADN et le copolymère. L'analyse structurale de polymères greffés ne nous permet pas de penser qu'un facteur autre que les métallosalens pourrait être responsable de la complexation. L'hypothèse selon laquelle les métallosalens sont responsables de la complexation est donc confirmée.

Les résultats préliminaires effectués à l'aide de l'électrophorèse sur gel d'agarose indiquent que nos polymétallosalens n'induisent pas la scission de l'ADN. Par contre,

d'autres groupes de recherche ont indiqué que certains métallosalens se lient à l'ADN et induisent la scission de l'ADN<sup>215-218</sup> ou empêchent la prolifération des lymphocytes.<sup>219</sup> Par conséquent, une variété d'études traitent de l'influence de l'ion métallique central du métallosalen sur l'effet de la complexation résultant entre celui-ci et l'ADN. Griffin a étudié en détail les complexes de manganèse et leur relation avec l'ADN.<sup>216</sup> Creuse et Rokita ont synthétisé quelques dérivés de nickel-salen qui induisent la réticulation de l'ADN.<sup>217</sup> Plus récemment, l'équipe de recherche de Routier a examiné l'interaction de l'ADN avec des complexes du cuivre(II) qui induit la scission de l'ADN.<sup>218</sup> L'examen des rapports ci-dessus indique clairement que beaucoup reste à comprendre au sujet du rôle structural des métallosalens et de son ion métallique central dans les processus de complexation de l'ADN.

## Conclusion

*«Qu'est-ce que cela veut dire "réussir ?" N'est-ce pas faire  
ce que l'on aime avec le plus d'élan possible ?»*

**Anne Hébert, Le temps sauvage**

La présente recherche porte sur la synthèse et la caractérisation de polymères organométalliques, biodégradables et biocompatibles. Les thèmes récurrents de ce projet sont les métallosalens. Son originalité repose sur la forme employée puisque aucun polyester de métallosalen n'avait été développé à ce jour. On le présente donc sous forme de polymère linéaire, greffé et réticulé pour des applications pharmaceutiques. Ces nouvelles structures ont été caractérisées et quelques tests préliminaires ont démontré tout leur potentiel d'application en tant qu'implant de régénération tissulaire et en tant que vecteur en thérapie génique. Ce projet de recherche pourrait maintenant être repris par un biochimiste afin d'explorer davantage les nombreux domaines d'applications possibles.

## Bibliographie

- (1) Schiff, H. *Ann. Suppl.* **1864**, 3, 343.
- (2) Cozzi, P. G. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, 410-421.
- (3) Gennari, C.; Piarulli, U. *Chem. Rev.* **2003**, 103, 3071.
- (4) Cozzi, P. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2895.
- (5) Yoon, T. P.; Jacobsen, E. N. *Science* **2003**, 299, 1692.
- (6) Achard, T.; Belokon, Y. N.; Fuentes, J. A.; North, M.; Parsons, T. *Tetrahedron* **2004**, 60, 5919-5930.
- (7) Katsuki, T. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, 437-444.
- (8) De, B. B.; Lohray, B. B.; Sivaram, S.; Dhal, P. K. *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, 6, 2105-2119.
- (9) Canali, L.; Sherrington, D. C.; Deleuze, H. *React. Funct. Polym.* **1999**, 40, 155-168.
- (10) Minutolo, F.; Pini, D.; Petri, A.; Salvadori, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 2293-2302.
- (11) Canali, L.; Sherrington, D. D. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 28, 85-93.
- (12) Makio, H.; Kashiwa, N.; Fujita, T. *Adv. Synth. Catal.* **2002**, 344, 477.
- (13) Bolm, C.; Munitz, K.; Hildebrand, J. *Comprehensive Asymmetric Catalysis*; Berlin, 1999.
- (14) Kurusu, Y. *Macromolecular Symposia* **2002**, 186, 7-13.
- (15) Belokon, Y. N.; Caveda-Cepas, S.; Green, B.; Ikonnikov, N. S.; Khrustalev, V. N.; Larichev, V. S.; Moscalenko, M. A.; North, M.; Orizu, C.; Tararov, V. I.; Tasinazzo, M.; Timofeeva, G. I.; Yashkina, L. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3968.
- (16) Belokon, Y. N.; Green, B.; Ikonnikov, N. S.; Parsons, T.; Tararov, V. I. *Tetrahedron* **2001**, 57, 771.
- (17) Gansauer, A.; Bluhm, H. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2771.
- (18) Samsel, E. G.; Srinivasan, K.; Kochi, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 7606.
- (19) Ruck, R. T.; Jacobsen, E. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4471.
- (20) Jacobsen, E. N.; Wu, M. H. *Comprehensive Asymmetric Catalysis*; Springer: Berlin, 1999.
- (21) Bandini, M.; Cozzi, P. G.; Umani-Ronchi, A. *Chem. Commun.* **2002**, 919.
- (22) Edulji, S. K.; Nguyen, S. T. *Organometallics* **2003**, 22, 3374.
- (23) Miller, A.; Jin, W.; Nguyen, S. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2953.
- (24) Busch, D. H.; Alcock, N. W. *Chem. Rev.* **1994**, 94, 585.
- (25) Niederhoffer, E. C.; Timmons, J. H.; Martell, A. E. *Chem. Rev.* **1994**, 84, 137.
- (26) Sharma, A. C.; Borovik, A. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8946.
- (27) Schaus, S. E.; D.Brandes, B.; Larrow, J. F.; Tokunaga, M.; Hansen, K. B.; Gould, A. E.; Furrow, M. E.; Jacobsen, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 1307.
- (28) Dimauro, E. F.; Kozlowski, M. C. *Organometallics* **2002**, 21, 1454.
- (29) Muller, P.; Fruit, C. *Chem. Rev.* **2003**, 103, 2905.
- (30) Belokon, Y. N.; North, M.; Churkina, T. D.; Ikonnikov, N. S.; Maleev, V. I. *Tetrahedron* **2001**, 57, 2491.

- (31) Cozzi, P. G.; Dolci, L. S.; Garelli, A.; Montalti, M.; Prodi, L.; Zaccheroni, N. *Nez. J. Chem.* **2003**, 692.
- (32) Cozzi, P. G.; Papa, A.; Umani-Ronchi, A. *Tetrahedron* **1996**, 37, 4613.
- (33) Dimauro, E. F.; Kozlowski, M. C. *Org. Lett* **2001**, 3, 3053.
- (34) Minutolo, F.; Pini, D.; Sallvadori, P. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 3375-3389.
- (35) Kunesky, R. I.; Klan, N. H.; Abdi, S. H. R.; Iyer, P. *React. Funct. Polym.* **1997**, 34, 153-169.
- (36) De, B. B.; Lohray, B. B.; Dhal, P. K. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 12, 1097-1109.
- (37) De, B. B.; Lohray, B. B.; Sivaram, S.; Dhal, P. K. *Macromolecules* **1994**, 27, 2191-2207.
- (38) De, B. B.; Lohray, B. B.; Sivaram, S.; Dhal, P. K. *J. Polym. Sci. Chem Ed.* **1997**, 35, 1809-1831.
- (39) Hamada, T.; Fukuda, T.; Imanishi, H.; Katsuki, T. *Tetrahedron* **1996**, 52, 515-529.
- (40) Royer, G. P. *Biotechnol.* **1986**, 5, 297-312.
- (41) Marklund, S. L. *Biochem. J.* **1984**, 222, 649-655.
- (42) Omar, B. A.; McCord, J. M. *Mol. Cell. Cardiol.* **1991**, 23, 149.
- (43) McCord, J. K. *J. Free Radicals Biol. Med.* **1986**, 2, 307.
- (44) Droy-Lefaix, M. T.; Drouet, Y.; Geraud, G.; Hosford, D.; Braquet, P. *Free Radical Res. Commun.* **1991**, 12, 725.
- (45) Riley, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 6522-6528.
- (46) Faulkner, K. M.; Liochev, S. I.; Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 23471-23476.
- (47) Szabo, C.; Dawson, V. L. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, 19, 287-298.
- (48) Day, B. J.; Batinic-Haberle, J.; Crapo, J. D. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 26, 730-736.
- (49) Day, B. J.; Fridovich, I.; Crapo, J. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, 347, 256-262.
- (50) Day, B. J.; Shawen, S.; Lioche, S. I.; Crapo, J. D. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, 275, 1227-1232.
- (51) Doctrow, S. R. *Adv. Pharmacol.* **1997**, 38, 247-269.
- (52) Sharpe, M. A. *Biochem. J.* **2002**, 366, 97-107.
- (53) Bruce, A. J.; Malfroy, B.; Baudry, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, 93, 2312-2316.
- (54) Musleh, W.; Bruce, A.; Malfroy, B.; Baudry, M. *Neuropharmacology* **1994**, 33, 929-234.
- (55) Riley, D. P. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2573-2587.
- (56) Nishida, Y.; Watanabe, I.; Unoura, K. *Chem. Lett.* **1991**, 1517.
- (57) Gianello, P.; Saliez, A.; Bufkens, X. *Transplantation* **1996**, 62, 1664-1666.
- (58) Shirakawa, H.; Louis, E. J.; MacDiarmid, A. G.; Chiang, C. K.; Heeger, A. J. *J. Chem. Soc. Chem Commun.* **1977**, 578-591.
- (59) Ivory, D. M.; Miller, G. G.; Sowa, J. M.; Shacklette, L. W.; Chance, R. R.; Baughman, R. H. *J. Chem. Phys.* **1979**, 71, 1506-1533.
- (60) Nalwa, H. S. *Handbook of Organic Conductive Molecules and Polymers*; John Wiley and Sons Inc.: New York, 1997.
- (61) Clery, D. *Science* **1994**, 263, 1700-1714.

- (62) Atkins, P.; Jones, L. *Chimie Molécules, Matière, Métamorphoses*; 3 édition ed.; DeBoeck university: Bruxelles, 1998.
- (63) Brown, I. M.; Leopold, D. J.; Mohite, S.; Sandrecki, T. C. *Synthetic Metals* **1995**, 72, 269-274.
- (64) Kingsborough, R. P.; Swager, T. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 8825-8834.
- (65) Chung, T. C.; Kaufman, J. H.; Heeger, A. J.; Wudl, F. *Phys. Rev.* **1984**, B30, 702.
- (66) Hempenius, M. A.; Langeveld-Voss, B. M. W.; VanHaare, J. A. E. H.; Janssen, R. A. J.; Sheiko, S. S.; Spatz, J. P.; Moller, M.; Meijer, E. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 2798.
- (67) Miller, L. L.; Mann, K. R. *Acc. Chem.* **1996**, 29, 417.
- (68) Catanescu, O.; Grigoras, M.; Colotin, G.; Dobreanu, A.; Hurdud, N.; Simionescu, C. I. *Eur. Polym. J.* **2001**, 37, 2213.
- (69) McElvain, J.; Tatsuura, S.; Wudl, F.; Heeger, A. J. *Synth. Met.* **1998**, 95, 101.
- (70) Morgan, P. W.; Pletcher, T. C.; Kwolek, S. L. *Polym. Prepr.* **1983**, 24, 470.
- (71) Nepal, D.; Samal, S.; Geckeler, K. E. *Macromolecules* **1998**, 39, 2977.
- (72) Niu, H.-J.; Huang, Y.-D.; Bai, X.-d.; Li, X. *Materials Letters* **2004**, 58, 2979-2983.
- (73) Audebert, P.; Capdevielle, P.; Maumy, M. *New Journal of Chemistry* **1992**, 16, 697-703.
- (74) Ryder, K. S.; Morris, D. G.; Cooper, J. M. *Biosensors & Bioelectronics* **1997**, 12, 721-727.
- (75) Hathoot, A. A. *European Polymer Journal* **2000**, 36, 1063-1071.
- (76) Okamoto, Y.; Yeh, T. F.; Lee, H. S.; Skotheim, T. A. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **1993**, 31, 2573-2581.
- (77) Yousef, U. S. *European Polymer Journal* **2000**, 36, 1626-1644.
- (78) Aubert, P. H.; Neudeck, A.; Dunsch, L.; Audebert, P.; Capdevielle, P.; Maury, M. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1999**, 470, 77-88.
- (79) Miasik, J.; Hooper, A.; Tofield, B. J. *Chem. Soc. Faraday Trans. I* **1996**, 82, 1117.
- (80) Gilding, D. K.; Reed, A. M. *Polymer* **1979**, 20, 1459-1472.
- (81) Benicewicz, B. C.; Hopper, P. K. *J. Bioactive Comput. Polym.* **1991**, 6, 64-81.
- (82) Benicewicz, B. C.; Hopper, P. K. *J. Bioactive Comput. Polym.* **1990**, 5, 453-467.
- (83) Athanasiou, K. A.; Niederauer, G. G.; Agrawal, C. M. *Biomaterials* **1996**, 17, 93-105.
- (84) Amass, W.; Amass, A.; Tighe, B. *Polym. Int* **1998**, 47, 89-103.
- (85) Middlenton, J. C.; Tipton, A. J. *Biomaterials* **2000**, 21, 2335-2351.
- (86) Jacoby, M. *Chem. Eng. News* **2001**, 79, 30-56.
- (87) Uhrich, K. E.; Cannizzaro, S. M.; Langer, R. S. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 3181-3196.
- (88) Langer, R. *Nature* **1998**, 392, 5-29.
- (89) Jain, R. A. *Biomaterials* **2000**, 21, 2475-2491.
- (90) Panyam, J.; Labhasetwar, V. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, 55, 329-352.
- (91) Jung, T. K., W.; Breitenbach, A.; Kaiserlihg, E.; Xiao, J. X.; Kissel, T. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, 50, 147-164.
- (92) Carcaboso, A. M.; Herná'ndez, R. M.; Igartua, M.; Gasco'n, A. R.; Rosas, J. E.; Patarroyo, M. E.; Pedraz, J. L. *Int. J. Pharm.* **2003**, 260, 273-294.
- (93) Mu, L.; Feng, S. S. *J. Controlled Release* **2003**, 86, 33-51.



- (94) Gutierrez, I.; Herná'ndez, R. M.; Igartua, M.; Gasco'n, A. R.; Pedraz, J. L. *Vaccine* **2002**, *20*, 2181-2196.
- (95) Kawashima, Y.; Yamamoto, H.; Takenchi, H.; Fujioka, S.; Hino, T. P. *J. Controlled Release* **1999**, *62*, 279-294.
- (96) Vert, M.; Feijen, J.; Albertson, A.; Scott, G.; Chiellini, E. *Degradable polymers and plastics*; Redwood Press Ltd ed.: England, 1992.
- (97) Matsusue, Y.; Yamamuro, T.; Yoshii, S.; Oka, M.; Ikada, Y.; Hyon, S.; Jhikinami, Y. *J. App. Biomat.* **1991**, *2*, 1-12.
- (98) Cutright, D. E.; Perez, B.; Beasley, J.; Larson, W.; Posey, W. *Oral Surgery* **1974**, *37*, 142-152.
- (99) Miller, R. A.; Brady, J. M.; Cutright, D. E. *J. Biomed. Mater. Res* **1977**, *11*, 711-719.
- (100) Rozema, F. R.; Bos, R.; Boering, G.; Van Asten, J.; Nijenhuis, A.; Pennings, A. J. *App. Biomat.* **1991**, *2*, 23-28.
- (101) Nakamura, T.; Hitomi, S.; Watanabe, S.; Shimizu, Y.; Jamshidi, K.; Hyon, S.; Ikada, Y. *J. Biomed. Mater. Res* **1989**, *23*, 1115-1130.
- (102) Li, S. M.; Garreau, H.; Vert, M. *J. Mater. Sci. Mat. Med* **1990**, *1*, 131-139.
- (103) Göpferich, A. *Biomaterials* **1996**, *17*, 103-114.
- (104) Majola, A.; Vainionpaa, S.; Vihtonen, K.; Mero, M.; Vasonius, J.; Tormala, P.; Rokkanen, P. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **1991**, *268*, 260-269.
- (105) Schakenraad, J. M.; Hardonk, M.; Feijen, J.; Molenaar, I.; Nieuwenhuis, P. J. *Biomed. Mater. Res.* **1990**, *24*, 529-545.
- (106) Cutright, D. E.; Hunsuck, E. E. *Oral. Surg.* **1972**, *33*, 28-34.
- (107) Heller, J. *Pol. Sci. Tech.* **1986**, *34*, 357-368.
- (108) Baker, R. *Controlled release of biologically active agents*; John Willey and sons ed.: New York, 1987.
- (109) Manniar, M. L.; Kalonia, D. S.; Simonelli, A. P. *J. Pharm. Sci.* **1991**, *80*, 778-782.
- (110) Hollinger, J. O.; Battistone, G. C. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **1986**, *207*, 290-305.
- (111) Brady, J. M.; Cutright, D. E.; Miller, R. A.; Battistone, G. C. *J. Biomed. Mater. Res* **1973**, *7*, 155-166.
- (112) Stock, U.; Vacanti, J. P. *Annu. Rev. Med.* **2001**, *52*, 443.
- (113) Bellido, T.; Ali, A. A.; Gubrij, I.; Plotkin, L. I.; O'Brien, C. A.; Manolagas, S. C.; Jilka, R. L. *Endocrinology* **2005**, *146*, 4577-4583.
- (114) Borer, K. T. *Sports Medecine* **2005**, *35*, 779-830.
- (115) Brandao-Burch, A.; Utting, J. C.; Orriss, I. R.; Arnett, T. R. *Calcified Tissue International* **2005**, *77*, 167-174.
- (116) Piskin, E. *Mater. Sci. Forum* **1997**, *250*, 1.
- (117) Gunatillake, P. A. *Eur. Cells Mater.* **2003**, *5*, 1-33.
- (118) Campbell, N. A.; Mathieu, R. *Biologie: Quebec*, 1995.
- (119) Agrawal, C.; Athanasiou, K.; Heckman, J. *Mater. Sci. Forum* **1997**, *250*, 115.
- (120) Schugens, C.; Maquet, V.; Grandfils, C.; Jérôme, R.; Teyssie, P. *Polymer* **1996**, *37*, 1027.
- (121) Sepulveda, P.; Jones, J. R.; Hench, L. L. *J. Biomed. Mater. Res* **2002**, *59*, 340.

- (122) Boccaccini, A. R.; Roether, J. A.; Hench, L. L.; Maquet, V.; Jérôme, R. *Ceram. Eng. Sci. Oroc.* **2002**, *23*, 805.
- (123) Vile, R. G.; Russell, S. J.; Lemoine, N. R. *Gene Ther* **2000**, *2000*, 2-8.
- (124) Okuda, K.; Ihata, A.; Watabe, S.; Okada, E.; T, T. Y.; Hamajima, K.; Yang, J.; Ishii, N.; Nakazawa, M.; Okuda, K.; Nakajima, K.; Xin, K. Q. *Vaccine* **2001**, *19*, 3681-3691.
- (125) Bonadio, J.; Smiley, E.; Patil, P.; Oldstein, S. *Nat Med* **1999**, *5*, 753-759.
- (126) Oligino, T. J.; Yao, Q.; Ghivizzani, S. C.; Robbins, P. *Clin Orthop* **2000**, *379 suppl*, s17-30.
- (127) Luo, D.; Saltzman, W. N. *Nat. biotechnol* **2000**, *18*, 33-37.
- (128) Romano, G.; Michell, P.; Pacilio, C.; Giordano, A. *Stem Cells* **2000**, *18*, 19-39.
- (129) Zelphati, O.; Kguyen, C.; Ferrari, M.; Felgner, J.; Tsai, Y.; Felgner, P. L. *Gene Ther* **1998**, *5*, 1272-1282.
- (130) Park, I. K.; Kim, T. H.; Park, Y. H.; Shin, B. A.; Choi, E. S.; Chowdhury, E. H.; Akaike, T.; Cho, C. S. *J. Control Release.* **2001**, *2001*, 349-362.
- (131) Gao, X.; Huang, L. *Biochemistry* **1996**, *35*, 1027-1036.
- (132) Brown, M. D.; Schatzlein, A. G.; Uchegbu, I. F. *Int J Pharm* **2001**, *229*, 1-21.
- (133) Li, S.; Huang, L. *Gene Ther* **1997**, *4*, 891-900.
- (134) Boussif, O.; Delair, T.; Brua, C.; Veron, L.; Pavirani, A.; Kolbe, H. V. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 877-883.
- (135) Gonzales, H.; Hwang, S. J.; Davis, M. E. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 1068.
- (136) Murphy, J. E.; Uno, T.; Hamer, J. D.; Cohen, F. E.; Dwarki, V.; Zuckermann, R. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 1517-1522.
- (137) Wetering, P. v. d.; Moret, E. E.; Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M.; Steenbergen, M. J. v.; Hennink, W. E. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *10*, 589-597.
- (138) Maurer, N.; Mori, A.; Palmer, L.; Monck, M. A.; Mok, K. W.; Mui, B.; Akhong, Q. F.; Cullis, P. R. *Mol Membr Biol* **1999**, *16*, 129-140.
- (139) Monk, J. A.; Mori, A.; Lee, D.; Tam, P.; J.Wheerer, J.; Cullis, P. R.; Scherrer, P. *J Drug Target* **2000**, *7*, 439-452.
- (140) McKenzie, D. L.; Kwok, K. Y.; Rice, K. G. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 9970-9977.
- (141) Choi, J. S.; Lee, E. J.; Choi, Y. H.; Jeong, Y. J.; Park, J. S. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 62-65.
- (142) Katayose, S.; Kataoka, K. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 702-707.
- (143) Han, S.; Mahano, R. I.; Sung, Y. K.; Kim, S. W. *Mol Ther* **2000**, *2*, 302-317.
- (144) Godbey, W. T.; Wu, K. K.; Mikos, A. G. *J biomed Mater Res* **1999**, *45*, 268-275.
- (145) Fischer, D.; Bieber, T.; Li, Y.; Elsasser, H. P.; Kissel, T. *Pharmaceutique Research* **1999**, *16*, 1273-1279.
- (146) Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 7297-7301.
- (147) Blessing, T.; Kurs, M.; Holzhauser, R.; Kircheis, R.; Wagner, E. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 529-537.
- (148) Qin, L.; Pahud, D. R.; Bielinska, Y.; Kukowska-Latallo, J. F.; Baker, J. R.; Bromberg, J. S. *Hum. Gene Ther.* **1998**, *9*, 553-560.
- (149) Zhang, Z. Y.; Smith, B. D. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 805-814.

- (150) Rao, S. B.; Sharma, C. P. *J Biomed Mater Res* **1997**, *34*, 21-28.
- (151) Richardson, S. C.; Kolbe, H. V.; Duncan, R. *Int J Pharm* **1999**, *178*, 231-243.
- (152) Segura, T.; Shea, L. D. *Annual Review of Materials Research* **2001**, *S. I. Stupp Ed*, 25-46.
- (153) Brown, M. D.; Schatzlein, A. G.; Uchegbu, I. F. *Int. J. Pharm.* **2001**, *229*, 1-21.
- (154) Dunlap, D. D.; Maggi, A.; Soria, M. R.; Monaco, L. *Nuc Acids Res* **1997**, *25*, 3095-3101.
- (155) Lee, H.; Jeong, J. H.; Park, T. G. *J Control Rel* **2002**, *79*, 283-291.
- (156) Baatz, J. E.; Bruno, M. D.; Ciraolo, P. J.; Glasser, S. W.; Stripp, B. R.; Smyth, K. L.; Korfhagen, T. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 2547-2551.
- (157) Wagner, E.; Zeeke, M.; Cotten, M.; Beug, H.; Birnstiel, M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 3410-3414.
- (158) Schaffer, D. V.; Lauffenburger, D. A. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 28004-28009.
- (159) Harbottle, R. P.; Cooper, R. G.; Hart, S. L.; Ladhoff, A.; McKay, T.; Wagner, A. M.; Miller, A. D.; Coutelle, C. *Hum. Gene Ther.* **1998**, *9*, 1037-1047.
- (160) Duguid, J. G.; Li, C.; Logan, M. J.; Alila, H.; Rolland, A.; Tomlinson, E.; Sparrow, J. T.; Smith, L. C. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 2802-2814.
- (161) Bonadio, J.; Goldstein, S. A.; Levy, R. J. *Adv. Drug Del. Rev.* **1998**, *33*, 53-69.
- (162) Shea, L. D.; Smiley, E.; Bonadio, J.; Mooney, D. J. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 551-554.
- (163) Fang, J.; Zhu, Y. Y.; Smiley, E.; Bonadio, J.; Rouleau, J. P.; Goldstein, S. A.; McCauley, L. K.; Davidson, B. L.; Roessler, B. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 5753-5758.
- (164) Bonadio, J.; Smiley, E.; Patil, P.; Goldstein, S. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 753-759.
- (165) Luo, D.; Saltzman, W. M. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 893-895.
- (166) Chahwan, R., Université de Montréal, 2001.
- (167) Larrow, J. F.; Jacobsen, E. N. *J.Org. Chem.* **1994**, *59*, 1939-1942.
- (168) Wang, Y.-X. R., J. L.; Spillman, W. B., Jr.; Claus, R. O. *Pharmaceutical research* **2004**, *21*.
- (169) Rivers, T. J. H., T. W.; Schmidt, C. E. *Adv. Funct. Mater.* **2002**, *12*, 33-37.
- (170) Mikos, A. G.; Bao, Y.; Cima, L. G.; Ingber, D. E.; Vacanti, J. P.; Langer, R. J. *Biomed Mater Res* **1993**, *27*, 183-189.
- (171) Stevens, P. M. *Polymer chemistry: a introduction*; 2nd ed., 1990.
- (172) Hollinger, J. O.; Battistone, G. C. *Clinical Orthopaedics and related research* **1986**, *207*, 290-305.
- (173) Deng, Z. X.; Lee, S. H.; Mao, C. D. *Journal of Nanoscience & Nanotechnology.* **2005**, *5*, 1954-1963.
- (174) Bock, R. *Residue Review* **1981**, *79*, 1-270.
- (175) Wang, C.; Li, H.; Zhao, X. *Biomaterials* **2004**, *25*, 5797-5801.
- (176) Sun, J. Q.; Shi, W. L.; Chen, D. Y.; Liang, C. F. *Journal of applied polymer science* **2002**, *86*, 3312-3315.
- (177) Routier, S.; Bernier, J.-L.; Catteau, J.-P.; Colson, P.; Houssier, C.; Rivalle, C.; Bisagni, E.; Baily, C. *Biochem. Chem.* **1997**, *8*, 789-792.

- (178) Domb, A. J.; Kost, J.; Wiseman, D. M. *Handbook of biodegradable polymers*; Canada Harwood Academic: Australie, 1997.
- (179) Arshady, R. *Biodegradable polymers*; Citus Books: Londre, 2003.
- (180) Tokiwa, Y.; Jarerat, A. *Biotechnology Letters* **2004**, *26*, 771-777.
- (181) Erickson, M.; Frech, R.; Glatzhofer, D. *Polymer* **2004**, *45*, 3389-3397.
- (182) Ghosh, S.; Ingnas, O. *Synthetic Metals* **1999**, *101*, 413-416.
- (183) Xie, H.; Guan, J.; Guo, J. *European Polymer Journal*. **2001**, *37*, 1997-2003.
- (184) Collier, J. H. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *50*, 574-584.
- (185) Cotton, M.; Wagner, E. *Curr. Opin. Biotech.* **1993**, *4*, 705-710.
- (186) Lin, D.; EV, E. V. *J. Adhesion Sc. Techn.* **2003**, *17*, 179-193.
- (187) Enomoto, K.; Ajioka, M.; Yamaguchi, A. In *Chem. Abstr.*; Patent 5,310,865; U.S., 1994; Vol. 120.
- (188) Kleine, J.; Kleine, H.-H. *Macromol. Chem.* **1959**, *30*, 23-49.
- (189) O'Keefe, B.; Hillmyer, M. A.; Tolman, W. B. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2001**, 2215-2236.
- (190) Dechy-Cabaret, O.; Martin-Vaca, B.; Bourissou, D. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 6147-6176.
- (191) Le Borgne, A.; Vincens, V.; Jouglard, M.; Spassky, N. *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* **1993**, *73*, 37-50.
- (192) Le Borgne, A.; Wisniewski, M.; Spassky, N. *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* **1995**, *36*, 217-231.
- (193) Wisniewski, M.; Le Borgne, A.; Spassky, N. *Macromol. Chem. Phys. Rev.* **1997**, *198*, 1227-1241.
- (194) Cameron, P. A.; Jhurry, D.; Gibson, V. C.; White, A. J. P.; Williams, D. J.; Williams, S. *Macromol. Rapid Commun.* **1999**, *20*, 616-624.
- (195) Bhaw-Luximon, A.; Jhurry, D.; Spassky, N. *Polym. Bull.* **2000**, *44*, 31-54.
- (196) Jhurry, D.; Bhaw-Luximon, A.; Spassky, N. *Macromol. Symp.* **2001**, *175*, 67-75.
- (197) Nomura, N.; Ishii, R.; Akakura, M.; Aoi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5938-5947.
- (198) Tang, Z.; Chen, X.; Pang, X.; Yang, Y.; Zhang, X.; Jing, X. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 965-974.
- (199) Zhong, Z.; Dijkstra, P. J.; Feijen, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 4510-4523.
- (200) Zhong, Z.; Dijkstra, P. J.; Feijen, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11291-11312.
- (201) Spassky, N.; Wisniewski, M.; Pluta, C.; Le Borgne, A. *Macromol. Chem. Phys.* **1996**, *197*, 2627-2638.
- (202) Ovitt, T. M.; Coates, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4072-4089.
- (203) Ovitt, T. M.; Coates, G. W. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2000**, *38*, 4686-4699.
- (204) Ovitt, T. M.; Coates, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1316-1335.
- (205) Majerska, K.; Duda, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1026-1043.
- (206) Radano, C. P.; Baker, G. L.; Smith, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1552-1567.
- (207) Agustin, D.; Rima, G.; Gornitzka, H.; Barrau, J. *J. Organomet. Chem.* **1999**, *592*, 1-17.
- (208) Okada, M. *Progress in Polymer Science.* **2002**, *27*, 87-133.

- (209) Kulkarni, R. K.; Moore, E. G.; Hegyeli, A. F.; Leonard, F. J. *Biomed. Mater. Res.* **1971**, *5*, 169.
- (210) Kawahara, H.; Hirabayashi, H.; Shikita, T. *J. Biomed Mater Res* **1980**, *14*, 597-605.
- (211) Cochran, G. V. B. *Surg. Forum* **1969**, *20*, 469-471.
- (212) Fujusato, T.; Ikada, Y. *Macromol. Symp.* **1996**, *103*, 73-83.
- (213) Freed, L. E.; Vunjaknovakovic, G.; Biron, R. J. *Biotechnology* **1994**, *12*, 689-693.
- (214) Beumer, G. J.; Blitterswijk, C. A.; Bakker, D.; Ponc, M. *Biomaterials* **1993**, *14*, 598-604.
- (215) Sato, K.; Chikira, M.; Fujii, Y., and Komatsu, A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun* **1994**, 625-634.
- (216) Gravert, D. J., and Griffin, J. H. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 4837-4851.
- (217) Muller; J. G., P., S. J., Rokita, S. E., and Burrows, C. J. *J. Inorg. Biochem.* **1994**, *54*, 199-211.
- (218) Routier, S.; Bernier, J.-L.; Waring, M. J., Colson, P.,; Houssier, C., and Baily, C. J. *Org. Chem.* **1996**, *61*, 2326-2334.
- (219) Rajaram, R., Balachandran, U. N., and Ramasami, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *205*, 327-345.

